

REC'D 27 FEB 2004

WIPO

PCT

PCT/KR 2004/000251

RO/KR 09.02.2004



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

출원 번호 : 10-2003-0084329  
Application Number

출원 년 월 일 : 2003년 11월 26일  
Date of Application NOV 26, 2003

출원인 : 주식회사 렉스진바이오텍  
Applicant(s) REXGENE BIOTECH CO., LTD



2004

년02

월09

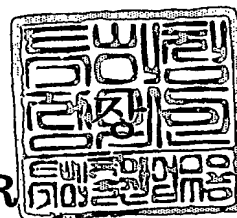
일

특

허

청

COMMISSIONER



BEST AVAILABLE COPY

## 【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.11.26
【발명의 명칭】	괴각 추출물을 유효성분으로 함유하는 갱년기 질환의 예방 및 치료용 조성물
【발명의 영문명칭】	Composition For Preventing And Treating Of Climacteric Symptom Comprising Extract Of Sophorae Fructus
【출원인】	
【명칭】	주식회사 렉스진바이오텍
【출원인코드】	1-1998-101186-9
【대리인】	
【성명】	김석현
【대리인코드】	9-1998-000634-1
【포괄위임등록번호】	2003-064332-1
【대리인】	
【성명】	이희숙
【대리인코드】	9-2002-000221-5
【포괄위임등록번호】	2003-064333-8
【발명자】	
【성명의 국문표기】	권석형
【성명의 영문표기】	KWON, Suk-Hyung
【주민등록번호】	550312-1010611
【우편번호】	137-859
【주소】	서울시 서초구 서초2동 1332 우성아파트 21동 1105호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	황보식
【성명의 영문표기】	HWANG, Bo Sik
【주민등록번호】	640205-1788626
【우편번호】	441-704
【주소】	경기도 수원시 권선구 금곡동 엘지빌리지 212-2002
【국적】	KR

도 7은 본 발명의 피각 추출물의 처리에 따른 산화질소 생성 효소 (endothelial nitric oxide synthase; ecNOS)의 발현 정도를 RT-PCR로 분석한 결과이다. GAPDH는 로딩 대조군으로 사용하였다(R-G: 실시예 1의 피각 추출물 처리군, R-A: 실시예 2의 피각의 효소분해 추출물 처리군, R-P: 실시예 3의 피각의 효소분해 추출물을 함유한 식품 조성물 처리군, S-S: 대두 엑스분말 처리군, E: 17- $\beta$ 에스트라디올(estradiol) 처리군, \*:R-P, E vs S-S,  $p < 0.05$ 에서 유의적인 차이가 있음).

도 8은 본 발명에 따른 피각 추출물의 파골세포 분화 억제능을 측정하기 위해 TRAP 염색 후 광학현미경으로 관찰하여 양성을 나타내는 파골 세포의 수를 카운팅한 결과이다(R-G: 실시예 1의 피각 추출물 처리군, R-A: 실시예 2의 피각의 효소분해 추출물 처리군, R-P: 실시예 3의 피각의 효소분해 추출물을 함유한 식품 조성물 처리군, E: 17- $\beta$ 에스트라디올(estradiol) 처리군, S-S: 대두 엑스분말 처리군).

도 9는 본 발명에 따른 피각 추출물의 파골세포 분화 억제능을 TRAP 염색 후 흡광도를 측정하여 분석한 결과이다(대조군: 세포 배양용 배지 처리군, R-G: 실시예 1의 피각 추출물 처리군, R-A: 실시예 2의 피각의 효소분해 추출물 처리군, R-P: 실시예 3의 피각의 효소분해 추출물을 함유한 식품 조성물 처리군, S-S: 대두 엑스분말 처리군, E: 17- $\beta$ 에스트라디올(estradiol) 처리군).

도 10은 본 발명의 피각 추출물을 공급한 난소가 적출된 흰쥐의 체중 변화를 나타낸 그래프이다(E: 17- $\beta$ 에스트라디올 투여군, R-G: 실시예 1의 피각 추출물 투여군, R-A: 실시예 2의 피각의 효소분해 추출물 투여군, S-S: 대두 엑스분말 투여군).

도 11은 본 발명의 피각 추출물을 공급한 난소가 적출된 흰쥐의 혈장 내 Dpd(Deoxypyridinoline)의 농도를 측정하기 위해 Dpd 농도와 흡광도와의 상관관계를 확립한 검량선이다( $Y=-0.1128X+1.6102$ ,  $R=0.9902$ ).

도 12는 본 발명의 피각 추출물의 공급에 따른 난소가 적출된 흰쥐의 혈장 내 Dpd 농도 변화를 나타낸 그래프이다(E: 17- $\beta$  에스트라디올 투여군, R-A: 실시예 2의 피각의 효소분해 추출물 투여군, R-G: 실시예 1의 피각 추출물 투여군, R-P: 실시예 3의 피각의 효소분해 추출물을 함유한 식품 조성물 투여군, S-S: 대두 엑스분말 투여군).

도 13은 본 발명의 피각 추출물의 공급에 따른 난소가 적출된 흰쥐의 실험전과 실험 후의 혈장 내 Dpd 농도차를 나타낸 그래프이다(대조군: 난소적출 후 식수 투여군, E: 17- $\beta$  에스트라디올 투여군, R-A: 실시예 2의 피각의 효소분해 추출물 투여군, R-G: 실시예 1의 피각 추출물 투여군, R-P: 실시예 3의 피각의 효소분해 추출물을 함유한 식품 조성물 투여군, S-S: 대두 엑스분말 투여군).

도 14는 본 발명의 피각 추출물의 Dpd 증가 억제효능을 비교한 그래프이다 (E: 17- $\beta$  에스트라디올 투여군, R-G: 실시예 1의 피각 추출물 투여군, S-S: 대두 엑스분말 투여군, R-P: 실시예 3의 피각의 효소분해 추출물을 함유한 식품 조성물 투여군, R-A: 실시예 2의 피각의 효소분해 추출물 투여군, \*:  $p<0.05$ 에서 유의성 없음, \*\*:  $p<0.05$ 에서 유의성 있음).

도 15는 본 발명의 피각 추출물의 공급에 따른 난소가 적출된 흰쥐의 혈장 내 칼슘의 농도 변화를 나타낸 그래프이다(E: 에스트라디올 투여군, R-A: 실시예 2의 피각의 효소분해 추출물 투여군, R-G: 실시예 1의 피각 추출물 투여군, R-P: 실시예 3의 피각의 효소분해 추출물을 함유한 식품 조성물 투여군, S-S: 대두 엑스분말 투여군).

도 16a는 본 발명의 피각 추출물을 공급한 난소가 적출된 흰쥐의 경골을 광학 현미경으로 관찰한 사진이다(배율 X16, A: 정상군(난소비적출군), B: 대조군 1(가장수술군), C: 대조군 2(난소적출군), D: 17- $\beta$ 에스트라디올 투여군, E: 실시예 1의 피각 추출물 투여군, F: 실시예 2의 피각의 효소분해 추출물 투여군, G: 실시예 3의 피각 추출물을 함유한 식품 조성물 투여군, H: 대두 엑스분말 투여군).

도 16b는 본 발명의 피각 추출물을 공급한 난소가 적출된 흰쥐의 경골의 소주골 면적을 측정 한 결과이다(E: 17- $\beta$ 에스트라디올 투여군, R-A: 실시예 2의 피각의 효소분해 추출물 투여군, R-G: 실시예 1의 피각 추출물 투여군, R-P: 실시예 3의 피각 추출물을 함유한 식품 조성물 투여군, S-S: 대두 엑스분말 투여군, \*:  $p < 0.05$ 에서 유의적인 차이가 있음).

도 17a는 본 발명의 피각 추출물을 공급한 난소가 적출된 흰쥐의 요추골을 광학 현미경으로 관찰한 사진이다(배율 X16, A: 정상군(난소비적출군), B: 대조군 1(가장 수술군), C: 대조군 2(난소적출군), D: 17- $\beta$ 에스트라디올 투여군, E: 실시예 1의 피각 추출물 투여군, F: 실시예 2의 피각의 효소분해 추출물 투여군, G: 실시예 3의 피각 추출물을 함유한 식품 조성물 투여군, H: 대두 엑스분말 투여군).

도 17b는 본 발명의 피각 추출물을 공급한 난소가 적출된 흰쥐 요추골의 소주골 면적을 측정 한 결과이다(E: 17- $\beta$ 에스트라디올 투여군, R-A: 실시예 2의 피각의 효소분해 추출물 투여군, R-G: 실시예 1의 피각 추출물 투여군, R-P: 실시예 3의 피각 추출물을 함유한 식품 조성물 투여군, S-S: 대두 엑스분말 투여군, \*:  $p < 0.05$ 에서 유의적인 차이가 있음).

## 【발명의 상세한 설명】

## 【발명의 목적】

## 【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- 22> 본 발명은 피각 추출물을 유효성분으로 함유하는 갱년기 질환의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 갱년기 질환의 예방 및 치료 효과를 가지는 피각 추출물, 상기 추출물을 포함하는 약학적 조성물 및 식품 조성물에 관한 것이다.
- 23> 갱년기 질환은 남성 호르몬 또는 여성 호르몬의 분비 감소에 의해 유발되는 질환을 말한다. 특히, 여성의 경우 난소의 노화로 인한 에스트로겐의 분비 감소에 의해 폐경을 전후로 약 2~10년에 걸쳐 나타나는 질환으로 고열, 땀, 불면증, 우울증, 요실금, 통증, 골다공증, 심근경색, 뇌졸중 및 고혈압과 같은 증상이 유발된다.
- 24> 상기 갱년기 질환 중 가장 대표적인 골다공증은 파골세포의 활성이 조골세포에 비해 증가함으로써 총골량(total bone mass)이 감소하는 증상을 말한다. 골다공증이 발생하면 피질뼈(cortical bone)의 폭이 감소되고 골수의 공동(cavity)이 확대되며 망상조직 골주가 낮아져서 뼈가 계속해서 다공질로 된다. 골다공증이 진전됨에 따라 뼈의 물리적 강도가 저하되어 요통과 관절통이 유발되고, 약간의 충격에도 뼈가 쉽게 부서진다.
- 25> 종래에는 이러한 갱년기 질환의 예방 및 치료를 위하여, 호르몬 대체요법, 비스테로이드계 제제 및 골다공증 치료를 위한 약물 치료법 등이 개발된 바 있다. 이 중에서 현재 호르몬 대체요법이 가장 효과적인 방법으로 사용되고 있다. 그러나, 상기와 같은 약물을 장기 투여하는 경

우에는 발암 위험성, 두통, 체중 증가와 같은 부작용 등이 발생하는 단점이 있다. 이로 인해 보다 안전하고 효과적인 치료제의 개발이 절실히 요구되고 있다.

6> 최근에는 약물을 장기 투여할 때에도 상기와 같은 부작용이 없고 에스트로겐을 대체할 수 있을 만큼 우수한 약효를 갖는 새로운 물질을 개발하고자 하는 연구가 활발히 진행되었다. 현재 에스트로겐 대체 물질로 관심의 초점이 되고 있는 것 중의 하나가 대두 등에 함유되어 있는 식물 에스트로겐(phytoestrogen)이다. 상기 식물 에스트로겐은 사람의 에스트로겐과 구조가 유사하여 인체 내에서 호르몬 또는 항호르몬 작용으로 호르몬과 연관된 질환에 영향을 미칠 수 있으며, 또한 호르몬 대체요법(hormone replacement therapy)을 대신할 수 있는 식이보충제로서의 사용이 검토되어 왔다. 지금까지 알려진 대표적인 식물 에스트로겐으로는 다이드제인(daidzein), 제니스테인(genistein), 포르모노네티н(formononetin), 비오카닌 A (biochanin A) 등의 이소플라본(isoflavanone)계 화합물, 쿠메스트롤(coumestrol) 등의 쿠메스탄(coumestan)계 화합물, 엔테롤락톤(enterolactone) 등의 리그난(lignan)계 화합물 및 엔테로디올(enterodiol) 등의 페놀(phenol)계 화합물 등이 있다.

<27> 대한민국특허 제348148호에는 식물 에스트로겐을 다량 포함하고 있으며 골다공증 예방 및 치료 효과를 갖는 갈근 추출물이 개시된 바 있으며, 식물 에스트로겐의 일종인 다이드제인이 다량 함유된 칩 뿌리 추출물의 골다공증 개선 효과가 보고된 바 있다(Kim C. S. et al., *Korean J. Food Sci. Technol.*, 34(4), 710~718, 2002). 또한, 대두 분말의 골다공증 개선 효과가 보고된 바 있다(양성범 외, *대한골대사학회지*, 6(1), 11~17, 1999).

- ▶ 한편, 괴각(*Sophorae Fructus*)은 회화나무(학명: *Sophora japonica* Linne)의 열매를 말한다. 상기 회화나무는 콩과에 속하는 낙엽교목으로 한국, 일본 및 중국 등에 분포하며, 그 부위에 따라 각기 다른 성분을 함유하고 있고 각기 다른 약리 작용을 나타낸다고 알려져 있다.
- 9> 회화나무의 꽃인 괴화(*Sophorae Flos*)의 약리 작용으로는 항염 작용, 항궤양 작용, 혈압저하 작용 및 동맥경화증에 대한 예방 및 치료효과가 알려져 있다(김창민 외, 중약대사전 제1권, 도서출판 정담, 496~509, 1998). 또한, 대한민국특허 제380865호에는 식물 에스트로젠을 포함하는 괴화 추출물의 골다공증 예방 및 치료효과가 개시된 바 있다.
- 30> 회화나무의 진은 괴교라 하여 파상풍 치료에 사용되어 왔으며, 회화나무의 잎(괴엽), 가지, 수피 및 근피는 항균활성이 있는 것으로 보고된 바 있다(Yook C. S. et al., *K. H. Pharma. Sci.*, 17, 75~87, 1989).
- 31> 회화나무의 열매인 괴각은 혈당상승 작용 및 항균 작용이 알려져 있으며, 치질, 여성의 자궁출혈, 요혈의 치료, 토혈, 각혈 및 탈항의 치료 등에 사용되어 왔다(김창민 외, 중약대사전 제1권, 도서출판 정담, 496~509, 1998).
- 32> 따라서, 회화나무는 그 부위에 따라 다른 약리 작용을 가지고 있어서 각 부위별로 어떤 약리 작용을 가지는지는 규명되어야 할 필요성이 있다.



- > 이에 본 발명자들은 갱년기 질환의 예방 및 치료 효과가 있으며 부작용이 없는 새로운 치료제를 찾고자 연구하던 중 회화나무 열매인 괴각의 추출물이 골다공증을 포함한 갱년기 질환을 매우 효과적으로 예방 및 치료하는 활성이 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

#### 【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- 34> 따라서, 본 발명의 목적은 갱년기 질환의 예방 또는 치료 효과를 가지는 괴각(*Sophorae Fructus*) 추출물을 제공하는 것이다.
- 35> 본 발명의 다른 목적은 상기 괴각 추출물의 제조방법을 제공하는 것이다.
- 36> 본 발명의 다른 목적은 괴각 추출물을 유효 성분으로 함유하는 갱년기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- 37> 본 발명의 다른 목적은 괴각 추출물을 유효 성분으로 함유하는 갱년기 질환의 예방 및 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

#### 【발명의 구성 및 작용】

- <38> 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 갱년기 질환의 예방 또는 치료 효과를 가지는 괴각 추출물을 제공한다.
- <39> 또한, 본 발명은 상기 괴각 추출물의 제조방법을 제공한다.
- <40> 또한, 본 발명은 괴각 추출물을 유효 성분으로 함유하는 갱년기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

- 1> 또한, 본 발명은 껍각 추출물을 유효 성분으로 함유하는 갱년기 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- 42> 본 발명에서 "껍각(*Sophorae Fructus*)"은 콩과식물인 회화나무의 열매를 말한다. 바람직하게는, 상기 껍각은 회화나무의 완숙한 열매를 말한다.
- 43> 본 발명의 껍각 추출물의 제조를 위해 사용되는 껍각은 완숙된 열매로서 고유의 색태 및 향미를 가지며 이미·이취가 없는 것이 바람직하다. 또한, 껍피는 녹갈색 내지 갈색이며 씨는 흑색 내지 흑갈색인 것이 바람직하다.
- 44> 본 발명의 껍각 추출물은 이에 한정되는 것은 아니나, 열수 추출방법에 의해 제조하는 것이 바람직하다.
- 45> 열수 추출시의 껍각과 물의 비율은 특별히 한정되지 않으나, 껍각 분말에 물을 3배~20배(중량기준)로 첨가할 수 있다. 바람직하게는, 추출효율을 증가시키기 위해서 껍각 분말에 대하여 물을 5배~10배(중량기준)로 첨가할 수 있다.
- 46> 추출시 온도는 상압 하의 실온에서 수행하는 것이 바람직하며 추출시간은 추출온도에 따라 다르지만, 1시간 내지 6시간, 바람직하게는 2시간 내지 4시간 추출한다. 또한, 추출시 교반기(shaker)로 교반할 경우에 더욱 추출효율을 증대시킬 수 있다.
- 47> 추출에 사용되는 껍각은 수확한 후 세척하여 그대로 사용하거나 건조하여 사용할 수 있다. 건조방법으로는 양건, 음건, 열풍건조 및 자연 건조하는 방법을 모두 사용할 수 있다. 또한, 추출효율을 증대시키기 위해 껍각 또는 그 건체를 분쇄기로 분쇄하여 사용할 수 있다.

- ▶ 바람직하게는, 본 발명의 피각 추출물은 피각을 20~40mesh의 크기로 분쇄한 다음 상기 피각 분말에 음용수를 3배~20배, 바람직하게는 5~10배로 첨가하고 100~130℃, 바람직하게는 120~125℃에서 1시간~3시간 동안 열수 추출한다. 상기 열수 추출액을 원심 분리하여 침전물을 제거하고 상등액을 회수함으로써 피각 추출물을 제조할 수 있다.
- 9> 또한, 상기와 같은 방법으로 수득한 본 발명의 피각의 열수 추출물을 추가로 효소처리 함으로써 피각의 효소분해 추출물을 수득할 수 있다. 즉, 상기와 같은 방법에 의해 수득한 열수 추출액에 효소를 추출액 대비 0.01~1 %(v/v)를 처리하여 4~24시간동안 반응시킨 다음 농축한 후 동결건조하여 제조할 수 있다. 상기 효소로는  $\alpha$ - 및  $\beta$ -아밀라아제, 펙티나아제를 사용할 수 있다.
- 50> 한편, 본 발명의 피각 추출물은 갱년기 질환을 예방 또는 치료하는 효과를 가지고 있다. 상기에서 "갱년기 질환"이란 호르몬 결핍에 의해 유발되는 질환을 말하며, 특히 여성의 경우 난소 기능의 정지로 인한 에스트로겐의 결핍에 의해 유발되는 질환을 말한다. 대표적인 갱년기 질환으로는 골다공증, 요통, 류마티스성 관절염, 퇴행성 관절염, 구루병, 골 연화증 및 파제트 골 질환(Paget's disease of bone)을 포함하는 골 대사성 질환, 협심증 및 동맥경화증을 포함하는 심혈관 질환 및 파킨슨병을 포함하는 퇴행성 신경 질환 등이 있다. 상기 골 대사성 질환이란 생체 내에서 파골세포와 조골세포의 평형이 깨어짐으로써 발생하는 질환으로 골다공증(osteoporosis)이 가장 대표적이다. 바람직하게는, 본 발명의 피각 추출물은 골다공증을 예방 또는 치료하는데 매우 우수한 효과가 있다.

- 1> 상기 본 발명의 피각 추출물의 갱년기 질환의 예방 또는 치료 효과는 생체 외(*in vitro*) 및 생체 내(*in vivo*) 실험을 통해 확인하였다.
- 2> 본 발명에 따른 피각 추출물의 생체 외 실험에서, 본 발명의 피각 추출물은 조골 세포의 증식을 촉진하며(도 1 참조), 골-흡수 사이토카인인 IL-1 beta와 IL-6의 분비를 억제하는 활성을 가지고 있음을 확인하였다(도 2a, 도 2b 및 도 3 참조). 또한, 본 발명의 피각 추출물은 골 재형성에 관여하는 성장인자인 IGF-1과 TGF- $\beta$ 의 발현을 촉진하는 활성을 가지고 있으며(도 4a, 도 4b 및 도 5 참조), 산화질소의 생성을 촉진하고(도 6 및 도 7), 파골세포의 분화를 효과적으로 억제하는 활성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다(도 8 및 도 9). 또한, 상기와 같은 활성은 본 발명의 피각 추출물이 저농도인 경우에도 우수한 것으로 나타났다.
- 53> 본 발명에 따른 피각 추출물의 생체 내 실험은 난소가 적출된 흰쥐를 이용하여 수행하였다. 상기 난소가 적출되어 에스트로겐 호르몬이 분비되지 않은 흰쥐에 본 발명의 피각 추출물을 공급하고 이에 따른 흰쥐의 체중의 변화, 혈청 내 골 교체율의 지표로서 파골세포에 의해 뼈의 매트릭스가 분해되는 경우 증가되는 Dpd 및 조골세포의 활성화에 따라 증가되는 칼슘 농도를 측정하였다. 그 결과, 본 발명의 피각 추출물은 에스트로겐의 대체 물질로 작용하여 체중의 감소를 억제하고(도 10 참조), Dpd 증가 억제능이 있으며(도 12~14 참조), 혈중 칼슘의 농도를 증가시키는 활성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다(도 15 참조). 나아가, 본 발명의 피각 추출물은 난소가 적출된 흰쥐에서 골밀도의 지표가 되는 경골과 요추골의 소주골 면적의 감소를 억제하는 활성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다(도 16 및 도 17 참조).

- 4> 따라서, 본 발명은 상기 피각 추출물을 유효성분으로 함유하는 갱년기 질환의 예방 또는 치료 용 약학적 조성물을 제공한다. 상기 갱년기 질환으로는 호르몬 결핍에 의해 유발되는 질환을 모두 포함하며, 특히 여성의 경우 에스트로겐의 결핍에 의해 유발되는 질환을 포함한다. 예를 들면, 골다공증, 요통, 류마티스성 관절염, 퇴행성 관절염, 구루병, 골 연화증 및 파제트 골 질환(Paget's disease of bone)과 같은 골 대사성 질환, 협심증 및 동맥경화증과 같은 심혈관 질환 및 파킨슨병과 같은 퇴행성 신경 질환 등을 포함한다. 가장 바람직하게는, 상기 갱년기 질환으로는 골다공증을 포함한다.
- 55> 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양의 피각 추출물을 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기에서 "약학적으로 유효한 양"이란 질환을 치료 또는 예방하기에 충분한 추출물의 양을 말한다.
- 56> 본 발명에 따른 피각 추출물의 약학적으로 유효한 양으로는 1~600mg/day/체중kg, 바람직하게는 1~100mg/day/체중kg이다. 그러나, 상기 약학적으로 유효한 양은 질환 및 이의 중증정도, 환자의 연령, 체중, 건강상태, 성별, 투여 경로 및 치료기간 등에 따라 적절히 변화될 수 있다.
- 57> 상기에서 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 상기 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페

이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

- 58> 상기 약학 조성물은 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 약학 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀, 멸균 주사용액, 멸균 분말의 형태일 수 있다.
- 59> 본 발명에 따른 약학 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있다. 활성 성분의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 환자의 증정도 등의 여러 인자에 따라 적절히 선택될 수 있다.
- 60> 본 발명의 약학적 조성물은 갱년기 질환을 예방 또는 치료하는 효과를 가지는 공지의 화합물과 병행하여 투여할 수 있다. 상기 화합물의 예로는, 천연 비타민 D3, 에스트로겐, 알렌드로네이트(alendronate) 및 랄록시펜(raloxifene) 등이 있다.
- 61> 또한, 본 발명에 따른 피각 추출물은 갱년기 질환의 예방 또는 치료 목적으로 식품에 첨가될 수 있다. 따라서, 본 발명은 피각 추출물을 유효 성분으로 하는 식품 조성물을 제공한다. 본 발명의 식품 조성물은 기능성 식품(functional food), 영양 보조제(nutritional supplement), 건강 식품(health food) 및 식품 첨가제(food additives) 등의 모든 형태를 포함한다. 상기 유형의 식품 조성물은 당 업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다.

- 2> 예를 들면, 건강 식품으로는 본 발명의 피각 추출물 자체를 차, 주스 및 드링크의 형태로 제조하여 음용하도록 하거나, 과립화, 캡슐화 및 분말화하여 섭취할 수 있다. 또한, 본 발명의 피각 추출물과 갱년기 질환의 개선 및 예방효과가 있다고 알려진 공지의 활성 성분과 함께 혼합하여 조성물의 형태로 제조할 수 있다.
- 33> 또한, 기능성 식품으로는 음료(알콜성 음료 포함), 과일 및 그의 가공식품(예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마아말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(예: 햄, 소시지 콘비이프 등), 빵류 및 면류(예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게이트, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 젓, 유제품(예: 버터, 치즈 등), 식용식물유지, 마아가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소스 등) 등에 본 발명의 피각 추출물을 첨가하여 제조할 수 있다.
- <64> 또한, 본 발명의 피각 추출물을 식품 첨가제의 형태로 사용하기 위해서는 분말 또는 농축액 형태로 제조하여 사용할 수 있다.
- <65> 본 발명의 식품 조성물 중 본 발명의 피각 추출물의 바람직한 함유량으로는 식품 100g당 약 30~50g이다.
- <66> 바람직하게는, 본 발명의 피각 추출물을 유효성분으로 함유하는 식품 조성물은 특히, 골다공증에 효과가 있으며 칼슘의 생체 흡수를 촉진하는 공지의 활성 성분과 함께 혼합하여 건강 식품의 형태로 제조할 수 있다.
- <67> 가장 바람직하게는, 본 발명의 피각 추출물을 유효성분으로 함유하는 식품 조성물은 피각 추출물 30~50중량%, 해조칼슘 분말 30~50중량%, 결정 셀룰로오스 1~10중량%, 유단백가수분해

물 0.1~2중량%, 녹차엑스분말 0.1~2중량%, 상어연골추출물분말 0.1~2중량%, 키토올리고당 0.1~2중량%, 비타민 C 0.1~2중량%, 콜레겐 펩타이드 0.1~2중량%, 포도씨추출물분말 0.1~2중량%, 아밀라제(Amylase), 프로테아제(Protease), 셀룰라제(Cellulase), 리파아제(Lipase) 및 락타아제 효소 혼합물 0.1~2중량%, 비타민 D3 분말 0.1~0.3중량% 및 스테아린산 마그네슘 0.1~2중량%로 이루어질 수 있다.

- <68> 상기에서 해조칼슘은 김류, 우뚝가사리류 및 풀가사리류와 같은 홍조류로부터 추출된 것으로 뼈 성장에 필요한 칼슘은 물론 마그네슘, 아연, 철, 불소, 망간, 요오드, 셀레늄을 풍부하게 함유되어 있다. 본 발명의 식품 조성물에 상기 해조칼슘 분말을 칼슘 공급원으로 30~50중량% 첨가함으로써 본 발명의 피각 추출물의 골다공증의 예방 및 개선 효과가 상승작용을 나타내도록 할 수 있다.
- <69> 결정 셀룰로오스는 부용제로서 1~10중량%의 함량 범위로 첨가할 수 있다.
- <70> 유단백가수분해물은 유단백을 효소 또는 산으로 가수분해하여 식용에 적합하도록 가공한 것으로 상기 유단백가수분해물에는 칼슘의 체내흡수를 촉진하는 카제인포스포펩타이드(CPP)가 포함되어 있다. 따라서, 본 발명의 조성물에 상기 유단백가수분해물을 0.1~2중량% 범위로 첨가하여 본 발명의 피각 추출물의 골다공증 예방 및 개선 효과가 상승작용을 나타내도록 할 수 있다. 바람직하게는, 상기 유단백가수분해물은 카제인포스포펩타이드(CPP)가 12%이상인 것을 사용한다.
- <71> 녹차엑스분말 및 포도씨 추출물 분말에는 산화를 방지하고 염증을 억제하여 뼈의 소실을 막아 주는 폴리페놀 성분이 다량 함유되어 있다. 본 발명의 조성물에 상기 녹차엑스분말 및 포도씨



추출물 분말 각각 0.1~2중량%씩 첨가함으로써 본 발명의 피각 추출물의 골다공증 예방 및 개선 효과가 상승작용을 나타내도록 할 수 있다.

- 2> 상어연골추출물 분말은 연골의 구성성분인 콘드로이틴을 함유하고 있어 골다공증의 예방을 위해 매우 유용하다. 따라서, 본 발명의 조성물에 상기 상어연골추출물 분말을 0.1~2중량% 첨가함으로써 본 발명의 피각 추출물의 골다공증 예방 및 개선 효과가 상승작용을 나타내도록 할 수 있다.
- 73> 키토 올리고당은 게나 새우, 갑각류의 껍질에서 얻어지는 키틴, 키토산을 분해하여 생체 이용율을 높인 천연 저분자 다당류이다. 상기 키토올리고당은 높은 수용성으로 체내흡수율이 뛰어나 면역증강 및 부활작용, 항암작용, 항균작용, 혈당치 상승억제작용, 칼슘흡수촉진작용 등의 광범위한 고기능성 생리활성물질이다. 본 발명에서는 상기 키토 올리고당을 본 발명의 조성물에 0.1~2중량%의 함량으로 첨가함으로써 칼슘의 흡수가 촉진되도록 한다. 상기 키토 올리고당은 함량이 70%이상인 것을 사용하는 것이 바람직하다.
- 74> 비타민 C와 비타민 D3는 칼슘의 흡수를 촉진하는 것으로 알려져 있으며, 본 발명의 조성물에 상기 비타민 C 및 비타민 D3를 각각 0.1~2중량 및 0.1~0.3중량%씩 첨가함으로써 칼슘의 흡수가 촉진되도록 할 수 있다.
- 75> 콜라겐 펩타이드는 콜라겐 단백질의 골격형성과 성장에 도움을 주는 효과가 있으며, 본 발명의 조성물에 0.1~2중량%를 첨가한다.
- 76> 아밀라제(Amylase), 프로테아제(Protease), 셀룰라제(Cellulase), 리파아제(Lipase) 및 락타아제 효소 혼합물은 에너자임-P(Enerzyme-P)라는 상표명의 복합 효소제로서 판매되고 있는 것을 구입하여 사용할 수 있다. 상기 에너자임-P는 체내 소화흡수, 에너지 효율과 신진대사를

증진하는 생식의 핵심원료로 사용되고 있다. 본 발명의 식품 조성물에 상기 효소 혼합물을 0.1~2중량%의 함량으로 첨가하여 본 발명의 조성물이 체내에 소화흡수가 용이하게 되도록 한다.

- 77> 스테아린산 마그네슘은 무코다당과 콜라겐, 칼슘의 공급원으로 관절에 유용한 성분으로 알려져 있다. 본 발명의 식품 조성물에 상기 스테아린산 마그네슘을 0.1~2중량%를 첨가하여 본 발명의 피각 추출물의 골다공증 예방 및 개선 효과가 상승작용을 나타내도록 할 수 있다.
- 78> 본 발명의 피각 추출물과 상기의 칼슘 공급원 및 칼슘의 생체 흡수를 촉진시키는 성분들을 함께 혼합된 식품 조성물은 갱년기 질환, 특히 골다공증의 예방 및 치료에 상승효과가 있다.
- 79> 이하, 본 발명의 구체적인 방법을 실시예를 들어 상세히 설명하고자 하지만 본 발명의 권리범위는 이들 실시예에만 한정되는 것은 아니다.

#### <80> <실시예 1>

#### <81> 피각 추출물의 제조

- <82> 피각(제성 약업사, 경동시장내) 20kg을 건식 분쇄기를 이용하여 30mesh의 크기로 분쇄하였다. 상기 분쇄물에 음용수를 첨가하여 10배로 희석한 후(분쇄물:음용수=9:1) 100℃에서 4시간 동안 가열하였다. 그 후 50℃로 냉각시킨 다음 100mesh의 여과포를 사용하여 여과한 후 다시 200mesh 여과포로 여과하여 침전물을 제거하고 여과액을 수득하였다. 상기 상등액을 농축기를

이용하여 1/5의 부피가 되도록 농축함으로써 괴각 추출물을 제조하였다. 또한, 상기 농축액을 분무건조기를 이용하여 분무건조하여 분말화함으로써 실험에 사용하였다.

33> <실시예 2>

34> 괴각의 효소분해 추출물 제조

85> 상기 실시예 1의 방법으로 제조된 괴각의 열수 추출액을 여과포로 여과하여 수득한 여과액에 0.5%(v/v)의 농도가 되도록 아밀라아제를 첨가하여 50℃에서 16시간 동안 효소반응을 수행하였다. 상기 반응액을 농축기를 이용하여 1/5의 부피가 되도록 농축함으로써 괴각의 효소분해추출물을 제조하였다. 또한, 상기 농축액을 분무건조기를 이용하여 분무건조하여 분말화함으로써 실험에 사용하였다.

<86> <실시예 3>

<87> 괴각 추출물을 함유하는 식품 조성물의 제조

<88> 상기 실시예 2에서 제조한 괴각의 효소분해 추출물을 함유하는 식품 조성물을 제조하였다.

상기 실시예 2의 괴각의 효소분해 추출물 분말 235g, 미소성 해조칼슘 분말 200g(대덕약업, 경기도), 결정 셀룰로오스 27.5g(대덕약업, 경기도), 유단백 가수분해물 5g(다인네츄럴, 서울), 녹차엑스 분말 5g(명식품, 경기도), 상어연골 추출물 분말 5g(신일상사, 서울), 키토 올리고당 4g(영덕키토산, 서울), 비타민 C 5g(로슈비타민, 서울), 콜라겐 펩타이드 2.5g(다인네츄럴, 서

을), 포도씨 추출물 분말 2.5g(대덕약업, 경기도), 에너자임-P 2.5g(성지물산, 경기도), 비타민 D3 분말 1g(로슈비타민, 서울) 및 스테아린산 마그네슘 5g(다인네츄럴, 서울)을 혼합함으로써 피각 추출물을 함유하는 식품 조성물을 제조하였다.

39> <실시예 4>

90> 생체 외(in vitro) 실험을 통한 피각 추출물의 골다공증 예방 또는 치료효과 조사

91> 피각 추출물의 골다공증 예방 또는 치료효과를 조사하기 위해 사람 조골세포를 분양 받아 사용하였으며, 흰쥐로부터 골수세포를 수득하고 상기 골수세포로부터 파골세포 및 조골세포를 분화시켜 사용하였다.

92> 또한, 본 발명의 피각 추출물의 사람 조골세포의 증식에 미치는 영향, 골-흡수 사이토카인인 IL-1 beta와 IL-6의 분비 억제 활성, 골 재형성에 관여하는 성장인자인 IGF-1과 TGF- $\beta$ 의 분비 촉진 활성, 조골세포의 산화질소 생성량에 미치는 영향 및 파골세포의 분화 억제 활성 등을 조사하였다. 모든 실험군간의 비교는 ANOVA 테스트를 이용하였으며, 특정 실험군간의 비교는 스튜던트 T-테스트(student T-test)를 이용하여 통계 처리한 후 신뢰구간(p value)이 0.05보다 작을( $P < 0.05$ ) 경우 통계적인 의의가 있는 것으로 판정하였다.

93> 4-1) 사람 조골세포의 배양

- 4> MG-63 사람 조골세포-유사 세포를 서울대학교 의과대학의 한국세포주은행에서 분양 받아 계대 배양 후 사용하였다. 상기 동결 MG-63 사람 조골세포-유사 세포는 37℃ 수욕(water bath)에서 약 1분간 해동시킨 후 1300rpm에서 5분간 원심분리한 다음 상층액을 제거하였다. 수득한 펠렛을 10% FBS를 첨가한 DMEM 배지에 재현탁한 후 25cm<sup>3</sup> 배양용 플라스크에 분주하여 배양하였다. 세포의 안정화를 위해 약 2주간의 배양기간을 두었고 세포가 안정하게 단일층(monolayer)을 이루는지 현미경으로 확인한 후 실험에 사용하였다.
- 95> 4-2) 파골세포(osteoclast cell) 및 조골세포(osteoblast cell)의 배양
- 96> 12주령의 SD계 쥐(한림실험동물연구소, 경기도)에 과량의 에테르를 흡입시켜 마취시킨 후 1마리 당 2개의 대퇴골(femur)을 직접 탈취한 다음 세척용 배지(15% FBS α-MEM 배지)로 수 차례 세척하고 최종 세척을 파골세포 배지(0.28mM L-아스코르브산-2-인산이 포함된 15% FBS α-MEM 배지)로 수행한 다음 대퇴골의 양끝부위(epiphyses)를 제거한 후 25개이지 주사바늘을 이용하여 약 10ml의 골수세포를 수득하였다.
- 97> 상기에서 수득한 골수세포에 10ml의 파골세포 배지를 추가하여 75cm<sup>3</sup> 배양용 플라스크에 분주한 다음 24시간 동안 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 및 100% 습도 하에서 배양하였다. 배양 후 신선한 배지로 갈아주었고 10일간 2차례 배지를 재공급하여 배양한 다음 실험에 사용하였다.
- 98> 조골세포는 상기 파골세포와 동일한 방법으로 10ml의 골수세포를 취한 다음 100μm의 세포 여과기(cell strainer)로 여과한 후 원심분리하여 상층액을 제거하고 대퇴골당 5ml가 되도록 일차 배양용 배지(0.28 mM L-아스코르브산 2-포스페이트와 10nM 텍사메탄손이 포함된 15% FBS

$\alpha$ -MEM 배지)에 재현탁하였다. 현탁한 골수세포를 75cm<sup>3</sup>의 배양용 플라스크에 대퇴골당 20ml가 되도록 일차 배양용 배지를 추가하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 및 100% 습도 하에서 배양한 후 배양 제 2일째 및 제4일째에 동일한 배지로 교환하였다. 배양 제6일째에 트립신을 처리한 후 조골세포 배양용 배지(0.28mM L-아스코르브산 2-인산과 10nM 텍사메타손이 포함된 15% FBS  $\alpha$ -MEM 배지)로 배지를 교환하여 배양하였다.

99> 상기 조골세포 및 파골세포의 배양상태는 실험 전에 현미경으로 확인하였고 트립판 블루 염색법(trypan blue dye exclusion method)으로 세포 생존능을 확인한 후 실험에 사용하였다.

100> 4-3) 피각 추출물의 처리에 따른 조골세포의 증식 정도

101> 피각 추출물의 처리에 따른 조골세포 증식 정도를 조사하고자, 실시예 1의 피각 추출물 분말(R-G), 실시예 2의 피각의 효소분해 추출물 분말(R-A) 및 실시예 3의 피각 추출물이 함유된 식품 조성물(R-P)을 상기 실시예 4-1)의 MG-63 사람 조골세포-유사 세포에 처리하고 3일간 배양한 후 상기 추출물이 세포 증식에 미치는 영향을 MTT 방법으로 조사하였다. 또한, 비교군으로는 대두 엑스분말(신동방), 골다공증 치료제로 사용되고 있는 17- $\beta$  에스트라디올(estradiol, sigma) 및 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, Sigma)를 상기 MG-63 조골세포-유사 세포에 각각 처리한 후 세포 증식에 미치는 영향을 비교 조사하였으며, 대조군에는 상기의 각 시료 대신 세포 배양용 배지를 처리하였다. 각 시료는 세포 배양용 배지로 희석하여 처리 용량이 10<sup>-4</sup>~10<sup>-12</sup>%의 범위가 되도록 하였다. 상기 LPS는 10  $\mu$ g/ml의 농도로 첨가하였다.

- 103> 세포의 미토콘드리아(Mitochondria) 활성에 비례하는 MTT 분석은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 상기  $1 \times 10^4$  이상의 MG-63 조골세포-유사 세포를 96 웰 조직 배양 플레이트(96 well flat-bottomed tissue culture plate)에  $100 \mu\text{l}$ 씩 분주한 다음 각 시료를  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$  및  $10^{-12}\%$ 의 용량으로 처리하고 72시간 동안 반응시켰다. 반응이 종료된 후  $10 \mu\text{l}$  MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bormide) 저장 용액(stock solution)을 첨가하여 혼합한 다음  $37^\circ\text{C}$ 에서 4시간 동안 배양하였다. 배양이 종료된 후  $100 \mu\text{l}$  이소프로판올/HCl (isopropanol/HCl)를 각 웰에 첨가한 후 완전히 혼합하여 색깔의 변화를 확인하고 1시간 내에 ELISA 플레이트 리더(plate reader)로  $570\text{nm}$ 에서 흡광도를 측정하였다.
- 104> 실험 결과, 실시예 1의 괴각 추출물(R-G군), 실시예 2의 괴각의 효소분해 추출물(R-A군), 실시예 3의 괴각 추출물을 함유하는 식품 조성물(R-P군) 및 대두 엑스분말(S-S군)을 처리한 경우에 모든 처리농도 범위에서 비슷한 증식효과를 나타냈다. 또한, 상기 증식효과는 대조군에 비해서는 높은 효과를 나타냈으나, 에스트라디올 처리군(E군)에 비해서는 낮게 나타났다. 그러나, 에스트라디올 처리군의 경우에는 세포 증식효과가 농도 의존적으로 나타나 에스트라디올을  $10^{-10}\%$  및  $10^{-12}\%$ 의 저농도로 처리하는 경우에는 증식 효과가 감소되었다. 반면에 미미하기는 하나 R-G군, R-A군, R-S군 및 S-S군의 경우에는 높은 농도보다는 낮은 농도( $10^{-10}\%$ )에서 높은 증식효과가 나타났다. 따라서, 본 발명의 괴각 추출물의 경우 농도 비의존적으로 조골세포의 증식을 촉진함을 알 수 있었다(도 1).
- <104> 상기 실험 결과로부터 본 발명에 따른 괴각 추출물의 조골세포 증식 효과는 에스트라디올 처리군에 비해 낮게 나타났으나, 저농도( $10^{-6} \sim 10^{-12}\%$ )에서도 조골세포의 증식을 촉진하는 효과가 있음을 알 수 있었다.

5> 4-4) 괴각 추출물이 조골세포의 IL-1 beta 및 IL-6 분비 활성화에 미치는 영향

16> 본 발명의 괴각 추출물이 조골세포에서 분비되는 IL-1 beta(interleukin-1) 및 IL-6(interleukin-6)의 생성을 억제하는지의 여부를 조사하였다. 상기 골-흡수 사이토카인인 IL-1 beta와 IL-6은 조골세포로부터 분비되어 파골세포의 분화인자인 OPG-L(osteoprotegrin ligand)의 발현을 촉진하며 이로 인해 파골세포의 분화가 촉진된다(Spelsberg, T.C., et al., *Mol. Endocrinol.*, 13, 819-828, 1999). 따라서, 상기 괴각 추출물이 조골세포에 영향을 주어 골-흡수 사이토카인인 IL-1 beta와 IL-6의 생성을 억제한다면 OPG-L의 발현이 억제되고 이로 인해 파골세포의 분화가 억제될 수 있다.

107> 본 발명의 괴각 추출물이 조골세포에서 분비되는 IL-1 beta와 IL-6의 생성을 억제하는 효과를 가지고 있는지를 확인하기 위하여, 상기 실시예 4-1)의 MG-63 사람 조골세포-유사 세포에 실시예 1의 괴각 추출물(R-G군), 실시예 2의 괴각의 효소분해 추출물(R-A군) 및 실시예 3의 괴각 추출물을 함유하는 식품 조성물(R-P군)을 세포 배양용 배지로 희석하여  $10^{-4}$ ~ $10^{-10}$ %의 농도범위로 처리한 다음 72시간이 경과한 후 ELISA 및 RT-PCR을 통해 IL-1 beta 및 IL-6의 발현 정도를 측정하였다. 이때, 비교군으로는 대두 엑스분말(S-S군) 및 에스트라디올을 동일한 방법으로 처리하였으며, 대조군에는 세포 배양용 배지를 첨가하였다.

<108> IL-1 beta 및 IL-6의 발현정도를 측정하기 위한 ELISA는 ELISA 키트 (Titerzyme ELISA kit, Assay designs)를 사용하여 제공된 프로토콜에 따라 실시한 다음 450nm에서 흡광도를 측정한 후 표준곡선(standard curve)을 통해 각 농도를 계산하였다.



- 9> 또한, IL-1 beta 및 IL-6의 mRNA 발현 정도를 측정하기 위해 RT-PCR를 다음과 같은 방법으로 실시하였다. 상기에서 각 시료를  $10^{-8}\%$ 의 농도로 처리한 MG-63 사람 조골세포-유사 세포로부터 총 RNA를 트리졸 방법(TRIZOL method)에 의해 추출하였다. 상기 총 RNA  $2\mu\text{l}$ 를 역전사반응을 수행함으로써 각각의 상보적 DNA를 제조하였다. DEPC 증류수  $12.85\mu\text{l}$ 에 총 RNA  $5\mu\text{l}$ ,  $10\text{pM}$ 의 프라이머 각  $1\mu\text{l}$ 씩을 첨가한 다음  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 변성시키고 여기에 역전사효소(5U)  $0.15\mu\text{l}$ 를 첨가하고  $42^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 반응을 수행하여 상보적 DNA를 제조하였다.
- 10> 상기 상보적 DNA를 주형으로 하여 중합효소연쇄반응을 수행하였다. 이때 실험의 재연성 및 일관성을 위해 원 스톱 RT-PCR 프리믹스(Accupower, Bioneer)를 사용하였다. 상기 반응액을 PCR 시스템(Dual-bay Dyad™ thermal cycler system, MJ Research)을 사용하여  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 5분,  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 30초,  $60^{\circ}\text{C}$ 에서 60초,  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 60초를 1 사이클로 하여 총 35 사이클을 실시하였다. 표준 대조군으로는 GAPDH를 사용하였다. 증폭된 PCR 산물은 젤 분석기(gell documentation system)를 이용하여 정량하였으며, 발현정도를 대조군에 대해 상대적인 %로 나타내었다. 상기에서 RT-PCR에 사용한 각각의 프라이머는 하기에 표시한 바와 같다.

<111> IL-1 beta의 센스 프라이머(서열번호 1)

<112> 5'-AGG CAC AAC AGG CTG CTC TG-3'

<113> IL-1 beta의 안티센스 프라이머(서열번호 2)

<114> 5'-TGG ACC AGA CAT CAC CAA GC-3'

<115> IL-6의 센스 프라이머(서열번호 3)

6> 5'-AGC GCC TTC GGT CCA GTT GC-3'

17> IL-6의 안티센스 프라이머(서열번호 4)

18> 5'-ACT CAT CTG CAC AGC TCT GG-3'

19> ELISA 분석 결과, 실시예 1의 피각 추출물 처리군(R-G군), 실시예 2의 피각의 효소분해 추출물 처리군(R-A군) 및 실시예 3의 피각 추출물을 함유하는 식품 조성물 처리군(R-P군)의 경우 대조군에 비해 IL-1 beta 및 IL-6의 분비를 억제하는 것으로 나타났다.

20> IL-1 beta의 분비 억제능은 각 시료를 최고 농도인  $10^{-4}\%$ 로 처리한 경우 R-P군이 가장 우수한 것으로 나타났으며, R-G군 및 R-A군도 대두 엑스분말 처리군(S-S군) 및 에스트라디올 처리군에 비해 우수한 것으로 나타났다. 또한, 본 발명의 피각 추출물 처리군은 최저 농도인  $10^{-10}\%$ 로 처리한 경우에도 IL-1 beta의 분비를 억제하는 것으로 나타났으며, 비교군인 대두 엑스분말 처리군(S-S군) 및 에스트라디올 처리군에 비해 보다 낮은 농도에서도 IL-1 beta의 분비를 억제하는 효과를 가지고 있음을 알 수 있었다. 특히, R-P군의 경우 모든 처리 농도에서 일정한 양의 IL-1 beta(60pg/ml)를 분비하는 것으로 나타났다(도 2a).

21> IL-6의 분비 억제능은 각 시료를 최고 농도인  $10^{-4}\%$ 로 처리한 경우 실시예 1의 피각 추출물 처리군(R-G군)이 가장 우수한 것으로 나타났으며, 최저 농도인  $10^{-10}\%$ 로 처리한 경우에도 R-G군이 가장 우수한 것으로 나타났다. 특히, R-P군의 경우 모든 처리 농도에서 일정한 농도의 IL-6(110pg/ml)을 분비하는 것으로 나타났으며, 이로부터 본 발명의 피각 추출물이 S-S군 및 에스트라디올 처리군에 비해 보다 낮은 농도에서 IL-6을 억제하는 활성이 있음을 알 수 있었다(도 2b).

- 122> RT-PCR 결과도 상기 ELISA 결과와 유사한 패턴으로 나타났다. IL-1 beta의 발현 억제 효과는 괴각 추출물을 함유하는 식품 조성물군(R-P군)에서 가장 우수한 것으로 나타났으며, 실시예 1의 괴각 추출물 처리군(R-G군) 및 실시예 2의 괴각의 효소분해 추출물 처리군(R-A군)은 에스트라디올 처리군(E 군)과 유사한 정도로 나타났다. 대두 엑스분말 처리군(S-S군)의 경우에는 IL-1 beta 발현 억제능이 가장 낮게 나타났다. IL-6의 발현 억제 효과는 에스트라디올 처리군이 가장 우수한 것으로 나타났다. 한편, R-P군의 경우에도 IL-6의 발현 억제 효과가 우수한 것으로 나타났으며, S-S군에 비해서 그 효과가 우수한 것으로 나타났다(도 3).
- 123> 따라서, 본 발명의 괴각 추출물이 IL-1 beta 및 IL-6의 분비를 억제하여 파골세포의 분화를 억제할 수 있음을 알 수 있었으며, 또한, 이러한 활성이 종래의 골다공증 치료용 식품 조성물이나 약제에 비해 보다 낮은 농도에서도 나타날 수 있음을 알 수 있었다.
- 124> 4-5) 괴각 추출물이 조골세포의 IGF-1 및 TGF- $\beta$ 의 분비활성에 미치는 영향
- 125> 본 발명의 괴각 추출물이 조골세포의 IGF-1(Insulin like Growth Factor-1) 및 TGF- $\beta$  (transforming growth factor-beta)의 분비를 촉진하는지의 여부를 조사하였다. 골 재형성에 관여하는 성장인자인 IGF-1과 TGF- $\beta$ 는 조골세포의 복제(replication)를 자극시키고 콜라겐 및 기질합성을 향상시키는 것으로 알려져 있다. 특히, TGF- $\beta$ 는 파골세포의 기능을 억제하고 파골세포의 세포사멸(apoptosis)을 촉진하는 것으로 알려져 있으며, TGF- $\beta$ 가 증가됨에 따라

골 재흡수는 감소하게 된다(Spelsberg, T.C. et al., *J. Mol. Endocrinol*, 13, 819-828, 1999).

- 16> 본 발명의 피각 추출물이 조골세포에서의 IGF-1과 TGF- $\beta$ 의 분비를 촉진하는지의 여부를 조사하기 위하여, 각 시료를 상기 실시예 4-4)와 동일한 방법으로 MG-63 사람 조골세포-유사 세포에 처리하고 ELISA 및 RT-PCR을 실시하여 IGF-1과 TGF- $\beta$ 의 분비량 및 발현량을 측정하였다. IGF-1과 TGF- $\beta$ 의 발현정도는 대조군에 대해 상대적인 %로 나타내었다
- 27> ELISA 측정은 ELISA 키트(Quantikine, R&D system)를 사용하여 제품 사용설명서에 기재된 프로토콜에 따라 실시하였다. 그 후 상기 실시예 4-4)와 동일한 방법으로 흡광도를 측정하여 정량하였다. RT-PCR은 상기 실시예 4-4)와 동일한 방법으로 실시하였으며, 하기에 표시한 바와 같은 프라이머를 사용하였다.

128> TGF- $\beta$ 의 센스 프라이머(서열번호 5)

129> 5'-CGC CCT GTT CGC TCT GGG TAT-3'

130> TGF- $\beta$ 의 안티센스 프라이머(서열번호 6)

131> 5'-AGG AGG TCC GCA TGC TCA CAG-3'

132> IGF-1의 센스 프라이머(서열번호 7)

133> 5'-ATG CTC TTC AGT TCG TGT GT-3'

134> IGF-1의 안티센스 프라이머(서열번호 8)

135> 5'-AGC TGA CTT GGC AGG CTT GT-3'

- ▷ ELISA 분석 결과, IGF-1의 농도는 대조군에 비해 모든 실험군에서 높게 나타났다. 각 시료를  $10^{-4}\%$ 로 고농도로 처리한 경우 IGF-1의 농도는 에스트라디올 처리군(E 군)에서 가장 높게 나타났으며, 처리농도가  $10^{-6}\%$ 인 경우에는 실시예 1의 피각 추출물 처리군(R-G군)이 가장 높게 나타났다. 또한, 처리 농도가  $10^{-12}\%$ 로 저농도의 경우에는 실시예 1의 피각 추출물 처리군(R-G군), 실시예 2의 피각의 효소분해 추출물 처리군(R-A군) 및 실시예 3의 피각 추출물을 함유한 식품 조성물 처리군(R-P)에서 에스트라디올 처리군에 비해 높게 나타났다(도 4a).
- 37> TGF- $\beta$  농도는 각 시료를  $10^{-4}\sim 10^{-10}\%$  범위로 처리한 경우 에스트라디올 처리군에서 균일하게 높은 농도로 나타나 TGF- $\beta$  촉진활성이 높은 것을 알 수 있었으나, 에스트라디올을  $10^{-12}\%$ 의 저농도로 처리한 경우에는 TGF- $\beta$ 의 농도가 감소하여 대조군과 비슷한 수준을 유지하였다. 반면, 본 발명의 피각 추출물을 처리한 처리군인 R-G 및 R-A군의 경우에는 최저 농도인  $10^{-12}\%$ 로 처리한 경우에도 TGF- $\beta$ 의 분비를 촉진하는 활성이 높게 나타났다(도 4b).
- 138> 따라서, 상기 에스트라디올 처리군의 경우 처리농도가 낮아질수록 IGF-1 및 TGF- $\beta$ 의 분비에 미치는 약물학적 영향이 낮게 나타났으나, 본 발명의 피각 추출물 처리군(R-G, R-A 및 R-P군)의 경우에는 저농도에서도 효과가 있음을 알 수 있었다. 특히, 실시예 3의 피각 추출물을 함유한 식품 조성물 처리군(R-P군)의 경우에는 모든 처리 농도에서 균일하게 IGF-1 및 TGF- $\beta$ 의 분비를 촉진시킴을 알 수 있었다.
- <139> 또한,  $10^{-8}\%$ 로 처리한 세포로부터 RNA를 추출하여 RT-PCR 분석한 결과, IGF-1의 발현은 에스트라디올 처리군(E 군)에 비해 실시예 1의 피각 추출물을 처리한 군(R-G군) 및 실시예 3의 피

각 추출물을 함유한 식품 조성물을 처리한 군(R-P군)에서 가장 높게 나타났다. TGF- $\beta$ 의 경우에도 에스트라디올 처리군(E 군)에 비해 R-P군, R-A군 및 R-G군에서 매우 높게 발현되는 것으로 나타났다(도 5).

10> 따라서, 본 발명의 피각 추출물은 IGF-1 및 TGF- $\beta$ 의 발현을 촉진하는 효과가 있으며, 이러한 효과는 농도 비의존적임을 알 수 있었다. 즉, 본 발명의 피각 추출물은 저농도에서도 IGF-1 및 TGF- $\beta$ 의 발현을 촉진하여 파골세포의 기능을 억제할 수 있음을 알 수 있었다.

41> 4-6) 피각 추출물이 조골세포의 산화질소 생성에 미치는 영향

142> 피각 추출물의 처리가 산화질소(NO: nitric oxide)의 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 상기 산화질소는 골의 혈액으로의 재흡수(resorption), 즉, 골 손실을 조절하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 즉, 조골세포에서 분비되는 산화질소는 파골세포의 활성을 억제하여 골의 재흡수를 억제한다고 보고된 바 있다(Ralston S. H. et al., *Endocrinology*, 135, 330~336, 1994; Vant Hof R. J. et al., *Immunol.*, 103, 255~261, 2001).

143> 따라서, 피각 추출물의 처리가 산화질소의 생성에 미치는 영향을 조사하기 위해 산화질소 생성량 및 산화질소 생성 효소인 ecNOS(endothelial nitric oxide synthase)의 발현 정도를 측정하였다. ecNOS의 발현정도는 대조군에 대해 상대적인 %로 나타내었다.

144> 상기 실시예 4-4)와 동일한 방법으로 각 시료를  $10^{-4}$ ~ $10^{-12}$ %의 농도로 MG-63 사람 조골세포-유사 세포에 처리한 후 ELISA 분석을 통해 생성된 산화질소의 양을 측정하였으며,  $10^{-8}$ % 농도

로 처리한 세포로부터 상기 실시예 4-4)와 동일한 방법으로 총 RNA를 추출한 다음 RT-PCR 분석을 통해 생성된 ecNOS의 양을 측정하였다. RT-PCR에 사용한 프라이머는 하기에 표시한 바와 같다.

5> ecNOS의 센스 프라이머(서열번호 9)

16> 5'-AAG CCG CAT ACG CAC CCA GAG-3'

17> ecNOS의 안티센스 프라이머(서열번호 10)

48> 5'-TGG GGT ACC GCT GCT GGG AGG-3'

49> ELISA 분석 결과, 각 시료를  $10^{-4}\%$ 의 고농도로 처리한 경우 대두 엑스분말 처리군(S-S군)의 경우 산화질소의 생성량이 가장 높은 것으로 나타났다. 그러나,  $10^{-6}\% \sim 10^{-10}\%$ 로 처리한 경우에는 실시예 3의 피각 추출물을 함유한 식품 조성물 처리군(R-P군)이 상기 S-S군에 비해 산화질소의 생성량이 유의적으로 높게 나타났다. 또한, 각 시료를  $10^{-10} \sim 10^{-12}\%$ 의 저농도로 처리한 경우에는 본 발명의 피각 추출물(R-G군 및 R-A군) 및 실시예 3의 피각 추출물을 포함한 식품 조성물 처리군(R-P군)의 경우 에스트라디올 처리군(E군)에 비해 산화질소의 생성량이 높게 나타났다 (도 6).

150> 또한, RT-PCR 결과, ecNOS의 발현 정도는 R-P군이 가장 높은 것으로 나타났다(도 7).

151> 따라서, 본 발명의 피각 추출물 및 상기 피각 추출물을 포함하는 식품 조성물의 경우 산화질소의 생성을 촉진하며 ecNOS의 발현을 촉진하는 활성을 가지고 있으며 낮은 농도에서도 상기

활성이 나타남을 알 수 있었다. 또한, 이러한 활성이 에스트라디올과 유사하거나 그 보다 높은 수준으로 나타남을 알 수 있었다.

#### 32> 4-7) 피각 추출물의 처리에 따른 파골세포 분화 억제효과

53> 본 발명의 피각 추출물의 처리가 파골세포의 분화를 억제하는지 조사하였다. 이를 위해 상기 실시예 4-2)에서 분리 및 배양한 파골세포와 조골세포를 상호배양 (co-culture)하였다. 24웰 (multiwell™ 24well, Becton Dickinson)의 세포배양 접시에 각 웰에 파골세포를  $>1.5 \times 10^5$ 씩 분주한 후 여기에 조골세포를 각 웰당  $1 \times 10^3$ 개가 되도록 분주하였다. 상기 웰에 분화촉진인자인 M-CSF 50ng/ml를 각 시료와 함께 처리하여 5일간 배양하였다. 상기 각 시료는 실시예 1의 피각 추출물 (R-G군), 실시예 2의 피각의 효소분해 추출물(R-A군) 및 실시예 3의 피각 추출물을 함유한 식품 조성물(R-P군)을  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$  및  $10^{-12}\%$ 가 되도록 희석하여 제조하였다. 배양이 완료된 후 파골세포의 분화정도를 TRAP(tartrate-resistant acid phosphatase) 염색법으로 측정하였다. TRAP 염색은 산 인산가수분해효소 키트 (Acid Phosphatase kit, Sigma)를 사용하여 광학 현미경하에서 TRAP에 양성을 나타내는 세포핵을 카운팅하였다.

<154> 실험 결과, 본 발명의 피각 추출물의 파골세포 분화 억제 효과는 에스트라디올에 비해서는 낮게 나타났다. 그러나, 각 시료를  $10^{-4}\%$  및  $10^{-6}\%$ 의 고농도로 처리한 경우 대두 엑스분말(S-S군) 처리군에 비해 실시예 1의 피각 추출물 처리군(R-G군) 및 실시예 3의 피각 추출물을 함유한 식품 조성물 처리군(R-P군)의 파골세포



분화 억제능이 우수한 것으로 나타났다. 특히,  $10^{-8}\%$ ~ $10^{-12}\%$ 의 저농도로 처리한 경우 본 발명의 피각 추출물의 처리군(R-G, R-A 및 R-P군)은 대두 엑스분말 처리군(S-S군)에 비해 높은 것으로 나타났다. 또한, R-P군의 파골세포 분화 억제 효과는 모든 농도 범위에서 일정하게 나타났다(도 8).

55> 따라서, 본 발명의 피각 추출물 및 상기 피각 추출물을 포함하는 식품 조성물의 경우 파골세포의 분화를 억제하는 활성을 가지고 있음을 알 수 있었다.

56> <실시예 5>

157> 생체 내(*in vivo*) 실험을 통한 피각 추출물의 골다공증 예방 또는 치료효과 조사

158> 동물 실험을 통해 피각 추출물의 골다공증 예방 또는 치료효과를 조사하였다. 실험용 흰쥐의 난소를 적출하여 골다공증을 유발시킨 다음 상기 흰쥐에 본 발명의 피각 추출물을 공급하면서 이에 따른 체중, 성장률, 혈장 내 골 교체율의 지표인 Dpd(Deoxypyridinoline) 및 Ca(Calcium)의 농도 변화를 측정하였다. 또한, 본 발명의 피각 추출물의 공급에 따른 흰쥐의 경골과 요추골의 소주면적의 변화를 측정하였다. 모든 실험군간의 비교는 ANOVA 테스트를 이용하였으며, 특정군간의 비교는 스튜던트 T-테스트(student-T test)를 이용하여 통계 처리한 후 신뢰구간(p value)이 0.05보다 작은 경우 통계적인 의의가 있는 것으로 판정하였다.

<159> 5-1) 실험동물의 난소적출

- 실험동물로는 체중이 230~250g의 암컷 흰쥐(Sprague-Dawley)를 한림실험동물원(경기도)으로부터 구입하여 사용하였다. 상기 실험동물은 온도 23±1℃, 습도 40~60% 및 명암주기 12시간의 조건으로 사육하였으며, 기본사료(고형사료, 한림실험동물연구소)와 식수는 제한 없이 공급하였다. 단, 채혈 전일에는 식수만 공급하였다.
- 61> 난소적출 수술은 12주령의 흰쥐를 에테르 흡입 마취 후 등쪽 부위의 털을 면도기로 제거하고 70% 알코올로 수술부위를 소독한 다음 무균적으로 수술을 시행하였다. 한쪽 측배부 하단 부위 척추선을 따라 피부조직을 약 2~3cm 정도 절개한 다음 난소가 위치하는 근육 및 복막을 1.5cm 절개하여 난소를 노출시켰다. 난관을 실크(silk)로 결찰한 후 난소를 절제하고 실크를 사용하여 복막, 근육 및 피부를 봉합하였다. 반대측에 대해서도 동일한 방법으로 난소를 적출하였다. 대조군으로는 복막까지만 동일하게 시술하고 난소는 적출하지 않은 채로 다시 봉합하는 가장수술(sham operation)을 시행하였다. 수술 후 1주일간의 회복기를 가졌다.

#### 162> 5-2) 시료 투여 및 방법

- 163> 실험동물은 정상군(난소비적출군), 대조군 1(가장 수술군) 및 난소적출군으로 구분하고, 난소적출군은 다시 시료 비투여군인 대조군 2, 17-β에스트라디올 투여군(E 군), 실시예 1의 피각추출물 투여군(R-G군), 실시예 2의 피각의 효소분해 추출물 투여군(R-A군), 실시예 3의 피각추출물을 함유한 식품 조성물 투여군(R-P군) 및 대두 엑스분말 투여군(S-S군)으로 각 10마리씩 나누었다(표 1). 상기 각 실험군에 하기와 같은 투여량으로 시료를 투여하였으며 시료의 투여

기간은 난소적출 수술 후 1주일이 지난 13주령의 흰쥐를 사용하여 22주령까지 9주간으로 하였다.

#### 4> 【표 1】

시료 투여량 및 투여방법

그룹	시료 투여량 및 투여방법
정상군(난소비적출군)	시료 투여하지 않음
대조군 1(가장 수술군)	식수 1ml/day, 경구투여
대조군 2(난소 적출군)	식수 1ml/day, 경구투여
E 군	1 $\mu$ g/kg/day, 복강 내 주사
R-G군	0.556g/kg/day, 경구투여
R-A군	0.556g/kg/day, 경구투여
R-P군	0.556g/kg/day, 경구투여
S-S군	0.556g/kg/day, 경구투여

#### 65> 5-3) 체중 및 성장률 측정

166> 상기 실시예 5-2)의 각 군은 전자저울을 이용하여 매주 체중을 측정하였으며 측정된 체중으로부터 하기 식에 의해 1일 체중 증가율을 계산하였다.

167> 1일 체중 증가율 = (최종 체중 - 초기 체중) / 실험 일수  $\times 100$

168> 실험 결과, 난소적출수술 전의 체중은 각 군간에 통계적 차이가 없었다. 9주간 시료를 투여한 후의 체중은 각 군간에 근소한 통계적 차이를 보였다. 한편, 난소를 적출한 후 식수를 투여한 대조군 2에서는 급격한 체중 증가를 나타냈으나, 난소를 적출하지 않은 정상군, 가장 수술을 수행한 대조군 1 및 피각 추출물 또는 에스트라디올을 투여한 군에서는 체중 증가정도가

완만한 것으로 나타냈다(도 10 및 표 2). 이는 난소가 적출된 흰쥐의 경우 난소 제거 후 에스트로겐이 분비되지 않아 지방세포가 증가되어 체중이 급격하게 증가된 것으로 보이며, 난소가 적출되었으나 피각 추출물 및 에스트라디올을 투여한 경우에는 상기와 같은 에스트로겐의 보강 효과를 나타내는 활성 성분들에 의해 지방 세포의 증가가 억제되어 체중이 완만하게 증가된 것으로 생각되었다.

## 69&gt; 【표 2】

각 군의 1일 체중 증가율 그룹	체중(g)		체중 증가율(g/day)
	초기체중(12주령)	최종체중(22주령)	
정상군(난소비적출군)	231.4 $\pm$ 2.303 <sup>1)</sup>	294.2 $\pm$ 1.869	0.9968 $\pm$ 0.1 <sup>2)</sup>
대조군 1(가장 수술군)	242.1 $\pm$ 7.520	280.8 $\pm$ 4.336	0.6142 $\pm$ 0.2
대조군 2(난소적출군)	236.8 $\pm$ 5.147	335.6 $\pm$ 4.112	1.5809 $\pm$ 0.2
에스트라디올 투여군	238.8 $\pm$ 6.742	302.4 $\pm$ 9.885	1.0095 $\pm$ 0.1*
R-G군	241.2 $\pm$ 7.159	306.9 $\pm$ 11.662	1.0428 $\pm$ 0.1*
R-A군	244.3 $\pm$ 8.355	319.6 $\pm$ 23.697	1.1952 $\pm$ 0.1
R-P군	243.2 $\pm$ 2.903	307.2 $\pm$ 25.772	1.0158 $\pm$ 0.1*
S-S군	245.6 $\pm$ 9.341	322.1 $\pm$ 9.548	1.2142 $\pm$ 0.2

170> 1) 평균권 ±표준편차를 의미함.

171> 2) \*:  $p < 0.05$ 에서 유의적 차이가 있음.

172> 5-4) 피각 추출물의 공급에 따른 혈장 내 Dpd 농도의 변화

<173> 피각 추출물의 공급에 따른 혈장 내 Dpd(Deoxypyridinoline)의 농도 변화를 측정하였다. 상기 Dpd는 뼈의 매트릭스(matrix)내에서 교차결합(crosslink)을 형성함으로써 제1형 콜라겐 사슬(Type I collagen chain)을 안정화시키는 역할을 하며(Seyedin SM. et al., *Curr. Opin.*

*Cell Biol.* 2, 914-919, 1990; Delmas PD. Biochemical markers for the assessment of bone turnover. In Riggs BL, Melton LJ, Osteoporosis; Publisheres, 319-333, 1995), 파골세포에 의해 뼈의 매트릭스가 분해되면 Dpd는 혈액을 통해 소변으로 배출된다(Estell R. et al., *J. Bone Miner. Res.* 12, 59-65, 1997). 따라서, Dpd의 증가가 억제된다는 것은 골대사성 질환을 예방 또는 치료하는 활성을 가지고 있음을 의미한다 (Riggs BL., *West. J. Med.* 154, 63-77, 1991; Hesley RP. et al., *Osteoporosis int.* 8, 159-164, 1998).

74> 피각 추출물의 공급에 따라 혈장 내 Dpd의 증가가 억제되는지의 여부를 측정하기 위해, 상기 실시예 5-2)의 실험동물로부터 혈장을 수득하였다. 난소 적출수술 전(12주령, 실험 0주째)부터 2주 간격으로 흰쥐를 에테르 흡입 마취한 후 안와정맥에서 1.7~1.8ml를 채혈하였다. 또한, 9주간 시료를 투여한 후 도살 전(22주령, 실험 10주째)에 복대 정맥을 통해 채혈을 실시하여 즉시 원심 분리한 후 혈장을 수득하였다.

175> 상기 수득한 혈장 중 Dpd 농도는 항-Dpd 항체가 포함된 Dpd 농도 측정용 키트(Pyralinks-D, Quidel Corporation, USA)를 이용하여 경쟁적 효소 면역분석법 (competitive enzyme immunoassay)으로 측정하였다. 즉, 마이크로타이터 스트립 웰(microtiter strip well)에 항-Dpd 항체를 코팅시키고 혈장 내의 Dpd와 Dpd가 결합된 경쟁자(Dpd-alkaline phosphatase conjugate)가 경쟁적으로 반응하도록 한 다음 여기에 기질로 p-니트로페닐 포스페이트 (p-Nitrophenyl phosphate, pNPP)를 첨가하여 반응시킨 후 405nm에서 흡광도를 측정한 다음 Dpd 농도와 흡광도와의 상관관계를 확립한 검량선을 이용하여 Dpd 농도를 계산하였다(도 11)

- 10 > 실험 결과, 정상군(난소비적출군) 및 대조군 1(가장 수술군)의 경우 혈장 내 Dpd 농도가 10주 동안 거의 변화가 없었다. 난소적출 후 식수를 투여한 대조군 2의 경우에는 혈장 내 Dpd 농도가 계속적으로 급격히 증가하여 난소를 적출하지 않은 정상군에 비해 60% 정도가 증가한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 난소적출에 의해 에스트로겐 호르몬 분비가 감소하여 골다공증이 심화되었기 때문이라 사료된다. 에스트라디올 투여군(E 군), 실시예 1의 피각 추출물 투여군(R-G군), 실시예 2의 피각의 효소분해 추출물 투여군(R-A군), 실시예 3의 피각 추출물을 함유한 식품 조성물 투여군(R-P군) 및 대두 엑스분말 투여군(S-S군)의 경우에는 난소적출 수술 후 각 시료를 투여하기 전인 실험 1주까지는 Dpd 농도가 증가하다가 각 시료를 투여한지 9주 후(실험 10주째)에는 그 값이 감소하였다. 특히, R-G군 및 에스트라디올 투여군(E 군)의 경우에는 Dpd 농도가 급격하게 감소하는 것으로 나타났다(도 12).
- 177> 따라서, 본 발명의 피각 추출물은 Dpd 농도의 증가를 억제하는 활성을 가지고 있음을 알 수 있었다.

178> 5-5) 피각 추출물의 Dpd 증가 억제능 확인

- 179> 상기 실시예 5-4)의 결과를 바탕으로 각 시료를 9주 동안 투여한 후 Dpd 값의 변화를 하기 식에 의해 정량하였다.  $\Delta Dpd$  값이 음성이면 Dpd 농도가 감소하였음을 의미하며, 양성이면 Dpd 농도가 증가하였음을 의미한다.

<180>  $\Delta Dpd = \text{각 개별 동물의 } \Delta Dpd \text{의 합} / n$

- 11> 상기 식에서 각 개별 동물의  $\Delta Dpd$ 는 실험 동물에 시료를 투여하기 전의 Dpd와 9주 동안 시료를 투여한 후 Dpd의 차를 의미하며, n은 실험 동물의 수를 말한다.
- 32>  $\Delta Dpd$ 값을 계산한 결과, 난소를 적출한 후 식수만 투여한 대조군 2의 경우  $\Delta Dpd$  값이 높은 양성 값을 나타내어 골다공증이 상당히 진행되었음을 알 수 있었다. 반면에 본 발명의 피각 추출물 투여군인 R-G군 및 R-A군, 피각 추출물을 함유한 식품 조성물 투여군(R-P군), 에스트라디올 투여군(E 군) 및 대두 엑스분말 투여군(S-S군)의 경우에는 모두 음성 값을 나타내어 Dpd 억제능이 있음을 알 수 있었다. 이중에서 에스트라디올 투여군(E 군)의 경우 가장 큰 Dpd 억제능을 나타냈으며, 에스트라디올 투여군의 Dpd 감소량을 100%로 하였을 때 R-G군의 경우 60%, S-S군의 경우 14.5%, R-P군의 경우 1.2% 및 R-A군의 경우 0.7% 정도의 감소량을 나타냈다(도 13). 따라서, R-G군의 경우 S-S군에 비해 Dpd 감소능이 더 우수함을 알 수 있었다.
- 183> 또한, 본 발명의 피각 추출물의 효능을 확인하기 위해 실질적으로 골다공증이 진행된 대조군 2(난소적출군)의 Dpd 양에 대한 본 발명의 피각 추출물을 처리한 군의 Dpd 양을 하기 식에 의해 계산하였다.
- 184> 피각 추출물의 효능 =  $(\Delta Dpd_{\text{대조군2}} - \Delta Dpd_{\text{실험군}}) / \Delta Dpd_{\text{대조군2}}$
- 185> 상기 식에서  $\Delta Dpd_{\text{대조군}}$ 은 대조군 2의 시료 투여 전 Dpd 농도와 최종 Dpd 농도의 차를 말한다.

- 86>  $\Delta$ Dpd실험군은 각 시료를 처리한 실험군의 시료 투여 전 Dpd 농도와 최종 Dpd 농도의 차를 말한다.
- 187> 만약, 본 발명의 괴각 추출물의 효능값이 1보다 큰 경우 Dpd 억제효능이 있다고 판단할 수 있으며, 그 값이 클수록 효능이 우수하다고 판단할 수 있다. 계산된 값을  $p=0.05$ 에서 아노바 테스트에 의해 유의성을 검정하였다.
- 188> 그 결과, R-G군의 경우 에스트라디올과 거의 유사한 효능을 나타냈고 나머지 군의 경우에는 에스트라디올보다 낮은 효능을 나타냈다(도 14).
- 189> 5-6) 괴각 추출물의 공급에 따른 혈장 내 칼슘 농도의 변화
- 190> 일반적으로, 골형성지표로써 칼슘농도의 증가는 골이 형성됨을 의미한다. 따라서, 괴각 추출물의 공급에 따른 혈장 내 칼슘 농도의 변화를 킬레이트 발색법(OCPC법)을 이용하여 측정하였다(J. P. Riley, *Analytica Chimica Acta*, 21, 317-323, 1959). 실험동물의 혈장은 상기 실시예 5-4)와 동일한 방법으로 수득하였다. 혈장 중의 칼슘은 알칼리성 조건 하에서 OCPC와 결합하여 자홍색을 나타낸다. 따라서, 상기 자홍색의 흡광도를 측정함으로써 시약 중의 칼슘 농도를 정량할 수 있다. 본 실시예에서는 완충액으로 0.88mol/l 모노에타놀아민 완충액(pH 11.0)을 사용하였으며, 발색시약으로는 OCPC 0.1mmol/l과 8-피노리노론 11mmol/l을 사용하였다.



- 11> 실험 결과, 정상군(난소비적출군)과 대조군 1(가장 수술군)의 경우에는 시간의 경과에 따라 칼슘 농도가 조금씩 증가하는 경향을 나타냈다. 이는 실험동물의 성장에 따른 결과인 것으로 사료되었다. 난소적출 후 식수만 투여한 대조군 2의 경우에는 지속적으로 칼슘 농도가 감소하는 것으로 나타났으며, 실시예 1의 피각 추출물 투여군(R-G군), 실시예 2의 피각의 효소분해 추출물 투여군(R-A군), 실시예 3의 피각 추출물을 함유한 식품 조성물 투여군(R-P군), 에스트라디올 투여군(E 군) 및 대두 엑스분말 투여군(S-S군)의 경우에는 난소적출 수술 후 각 시료를 투여하기 전까지는 칼슘 농도가 감소하다가(실험 1주째) 각 시료를 투여한 이후로는 칼슘 농도가 지속적으로 증가하는 경향을 나타냈다. 특히, 에스트라디올 투여군(E 군)과 R-G군의 경우에는 칼슘 농도가 급격하게 증가하는 것으로 나타났다(도 15 및 표 3).

192> 【표 3】

피각 추출물의 공급에 따른 칼슘 농도의 변화

	0주	1주	10주
정상군(난소비적출군)	10.333±0.1003 <sup>1)</sup>	10.01±0.1391	11.386±0.571
대조군1(가장 수술군)	10.064±0.0678	9.322±0.177	10.94±0.853
대조군2(난소적출군)	10.2±0.1011	9.188±0.222	9.65±0.677
에스트라디올 투여군	10.217±0.1211	8.48±0.344	17.96±1.334
R-G	9.892±0.0753	8.656±0.389	16.386±0.743
R-A	10±0.1106	8.12±0.384	13.463±1.210
R-P	9.967±0.1003	8.11±0.339	14.125±0.872
S-S	10.483±0.3619	8.6±0.219	11.233±1.1938

<193> 1) 평균 ±표준편차

<194> 5-7) 피각 추출물의 공급에 따른 경골 및 요추골의 소주면적 측정

- 5> 피각 추출물이 뼈의 골밀도에 미치는 영향을 조사하고자 경골 및 요추골의 소주골 면적을 측정하였다. 상기 소주골(trabecular bone)은 골대사 작용이 가장 활발하게 일어나는 곳으로서, 외부 효과에 의한 뼈의 생성 및 골 흡수 작용이 가장 빠르게 반응하여 나타나는 곳이다. 따라서, 소주골의 면적을 측정함으로써 그 증감여부에 따라 골다공증이나 골다공증 유발 억제효과를 판단할 수 있다(Faugere MC. et al., *American Physiological Society*, E35-E38, 1986).
- 96> 피각 추출물의 공급에 따른 경골 및 요추골의 소주골 면적을 측정하기 위해 상기 실시예 5-2)의 각 실험군의 흰쥐를 희생한 다음 경골 및 요추골을 취하여 10% 포르말린 용액에 고정하였다. 포름산(formic acid)내에서 탈회를 수행하고 골조직 중 관찰할 부위를 수술칼로 절단하였다. 70% 알코올에서 100% 알코올과 아세톤에 이르는 단계별 탈수과정 후 자일렌으로 청명하고 파라핀 포매 실시하였다. 포매된 골조직을 마이크로톰으로 5마이크론으로 절단한 후 헤마토자일린 에오신 (Hematoxyline eosin, H&E) 염색을 실시하여 광학 현미경(Olympus BH-2)으로 관찰하였으며 요추골과 경골의 골단부를 정량적 및 형태계측학적으로 측정하였다.
- 197> 계측방법은 폴라로이드 디지털 카메라(Polaroid digital camera)로 광학 현미경(Olympus BH-2)의 1X 대물렌즈를 통해 영상을 얻은 후 컴퓨터 상에서 각 소주골의 윤곽선을 그리면 자동적으로 계산되는 프로그램을 사용하였으며, 골의 골단부 중 성장판의 직하부 이차골화부위 내에 있는 소주골을 모두 측정하였다. 면적은 컴퓨터에서 산출된 면적을 자동적으로 계산하였으며 영상분석시스템(Optimas ver 6.2, Media Cybernetics. Inc.)을 사용하여 분석하였다. 이들 수치의 평균을 통계처리하여 측정부위의 전체 면적에서 소주골이 차지하는 면적을 %로 정량화하여 분석하였다.

- 실험 결과, 경골의 경우 식수를 투여한 대조군 2(난소적출군)에 비해 실시예 1의 피각 추출물 투여군(R-G군), 실시예 2의 피각의 효소분해 추출물 투여군(R-A군) 및 실시예 3의 피각 추출물을 함유한 식품 조성물 투여군(R-P군)의 소주골 면적의 감소정도가 작게 나타났으며, 에스트라디올 투여군(E 군)과 비슷하거나 보다 높은 골밀도를 유지하는 것으로 나타났다. 특히, R-P군에서 소주골 면적의 감소정도가 작게 나타나 골다공증 유발 억제효과가 우수함을 알 수 있었다(도 16a 및 도 16b). 또한, 요추골의 경우에도 대조군에 비해 본 발명의 피각 추출물(R-A군 및 R-P군) 투여군에서 소주골 면적의 감소 정도가 작게 나타났다(도 17a 및 도 17b).

#### 【발명의 효과】

- 99> 이상, 상기 실시예를 통하여 설명한 바와 같이 본 발명에 따른 피각 추출물은 조골세포의 증식을 촉진하는 활성, 골-흡수 사이토카인의 분비 억제 활성, 골 재형성에 관여하는 성장인자의 분비 촉진 활성, 조골 세포의 산화질소 생성 촉진 활성 및 파골세포 분화 억제 활성을 가지고 있으며, 골흡수 지표의 농도를 감소시키고 골의 칼슘 농도 감소를 억제하며 골밀도의 감소를 억제하는 활성을 가지고 있으므로 골다공증을 포함한 갱년기 질환의 예방 또는 치료에 효과가 있다.

**【특허청구범위】****【청구항 1】**

갱년기 질환의 예방 또는 치료 효과를 가지는 피각(*Sophorae Fructus*) 추출물.

**【청구항 2】**

제1항에 있어서, 상기 갱년기 질환이 골다공증, 요통, 류마티스성 관절염, 퇴행성 관절염, 구루병, 골 연화증 및 파제트 골 질환(Paget's disease of bone)을 포함하는 골 대사성 질환, 협심증 및 동맥경화증을 포함하는 심혈관 질환 및 파킨슨병을 포함하는 퇴행성 신경 질환으로 이루어진 군 중에서 선택된 것임을 특징으로 하는 피각 추출물.

**【청구항 3】**

제2항에 있어서, 상기 갱년기 질환이 골다공증임을 특징으로 하는 피각 추출물.

**【청구항 4】**

피각 분말의 전체중량에 대해 3배~20배의 물을 피각 분말에 첨가하고 1시간~6시간 동안 가열하여 추출하는 것을 특징으로 하는 제1항의 피각 추출물의 제조방법.

**【청구항 5】**

제4항에 있어서, 피각을 추출한 후 피각 추출물에 아밀라아제 또는 펙티나아제를 0.01~1%(v/v)로 첨가한 후 4~24시간 동안 반응시키는 단계를 추가로 포함하는 제1항의 피각 추출물

의 제조방법.

【청구항 6】

제1항의 괴각 추출물을 유효 성분으로 함유하는 갱년기 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물

【청구항 7】

제6항에 있어서, 상기 갱년기 질환이 골다공증, 요통, 류마티스성 관절염, 퇴행성 관절염, 구루병, 골 연화증 및 파제트 골 질환(Paget's disease of bone)을 포함하는 골 대사성 질환, 협심증 및 동맥경화증을 포함하는 심혈관 질환 및 파킨슨병을 포함하는 퇴행성 신경 질환으로 이루어진 군 중에서 선택된 것임을 특징으로 하는 약학적 조성물.

【청구항 8】

제6항에 있어서, 상기 갱년기 질환이 골다공증임을 특징으로 하는 약학적 조성물.

【청구항 9】

제1항의 괴각 추출물을 유효 성분으로 함유하는 갱년기 질환의 예방 및 개선용 식품 조성물.

**【청구항 10】**

제9항에 있어서, 상기 식품 조성물은 피각 추출물 30~50중량%, 해조칼슘 분말 30~50중량%, 결정 셀룰로오스 1~10중량%, 유단백 가수분해물 0.1~2중량%, 녹차엑스분말 0.1~2중량%, 상어 연골추출물분말 0.1~2중량%, 키토올리고당 0.1~2중량%, 비타민 C 0.1~2중량%, 콜레겐 펩타이드 0.1~2중량%, 포도씨추출물분말 0.1~2중량%, 아밀라제(Amylase), 프로테아제(Protease), 셀룰라제(Cellulase), 리파아제(Lipase) 및 락타아제 효소 혼합물 0.1~2중량%, 비타민 D3 분말 0.1~0.3중량% 및 스테아린산 마그네슘 0.1~2중량%로 이루어진 것임을 특징으로 하는 식품 조성물.

**【청구항 11】**

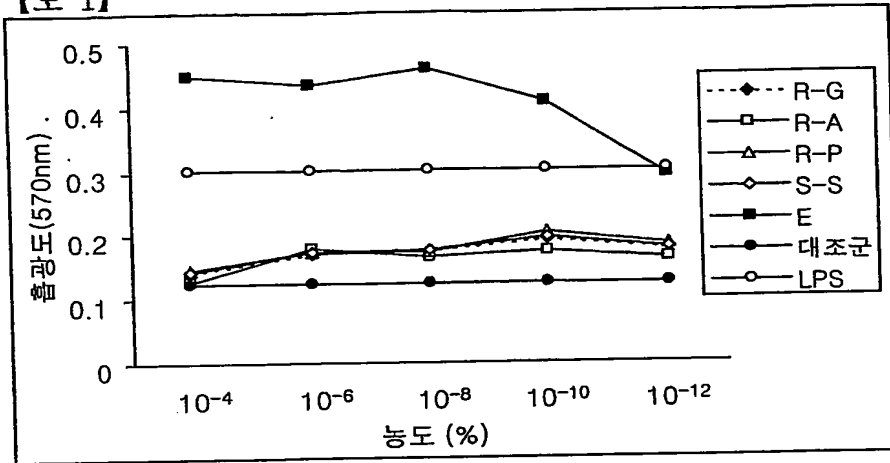
제9항에 있어서, 상기 갱년기 질환이 골다공증, 요통, 류마티스성 관절염, 퇴행성 관절염, 구루병, 골 연화증 및 파제트 골 질환(Paget's disease of bone)을 포함하는 골 대사성 질환, 협심증 및 동맥경화증을 포함하는 심혈관 질환 및 파킨슨병을 포함하는 퇴행성 신경 질환으로 이루어진 군 중에서 선택된 것임을 특징으로 하는 식품 조성물.

**【청구항 12】**

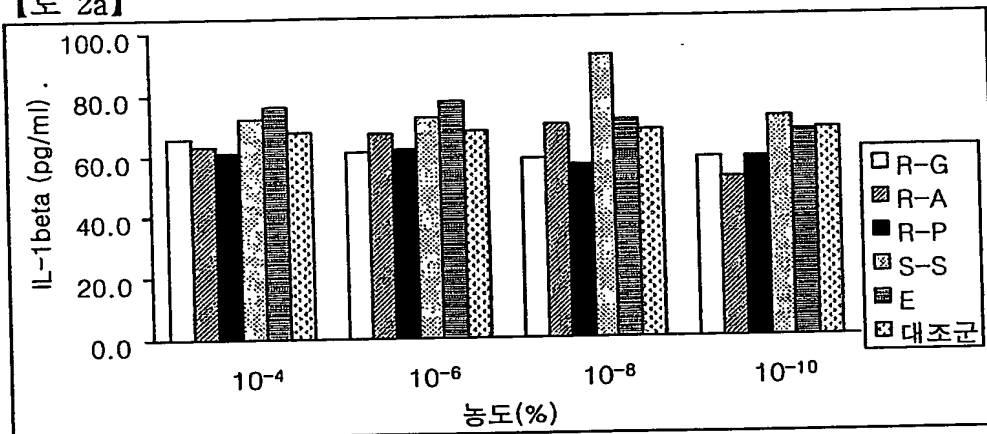
제9항에 있어서, 상기 갱년기 질환이 골다공증임을 특징으로 하는 식품 조성물.

【도면】

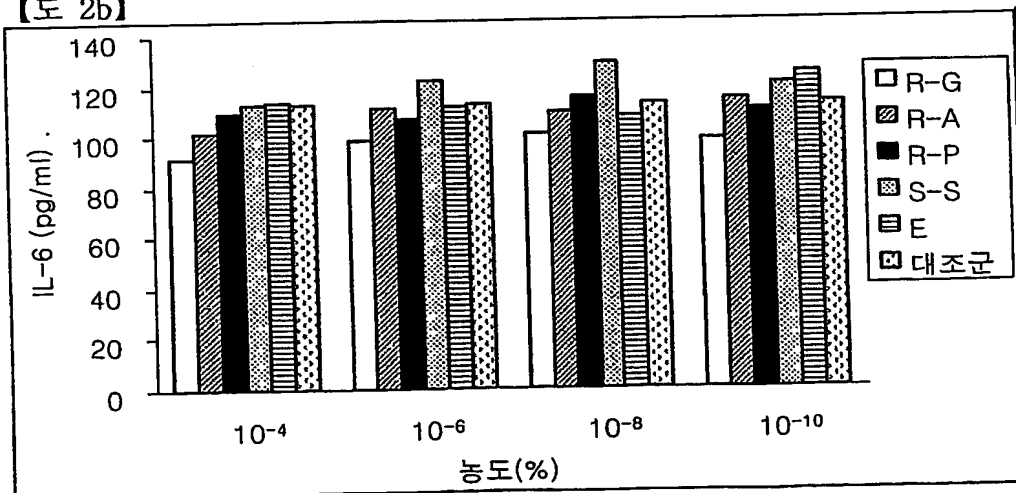
【도 1】



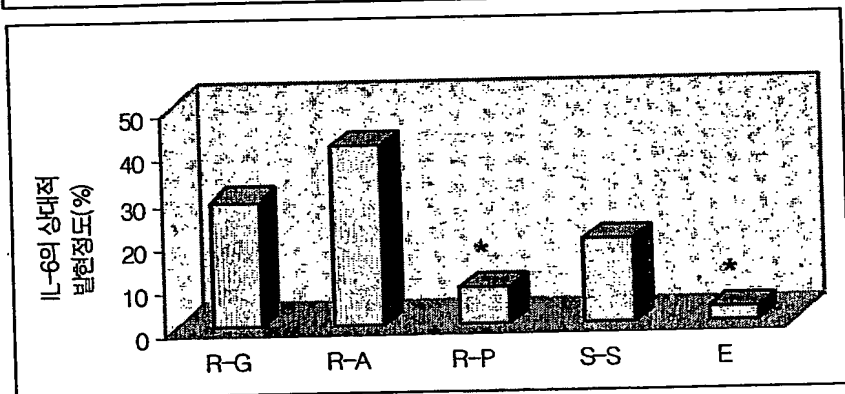
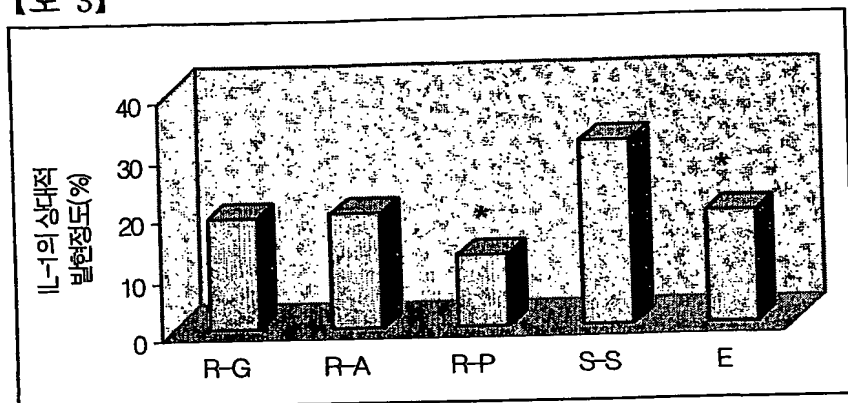
【도 2a】



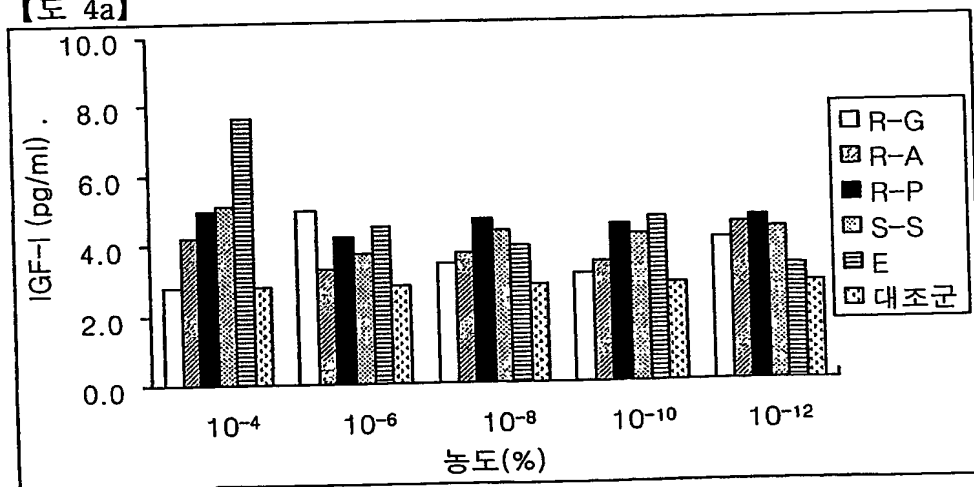
【도 2b】



【도 3】

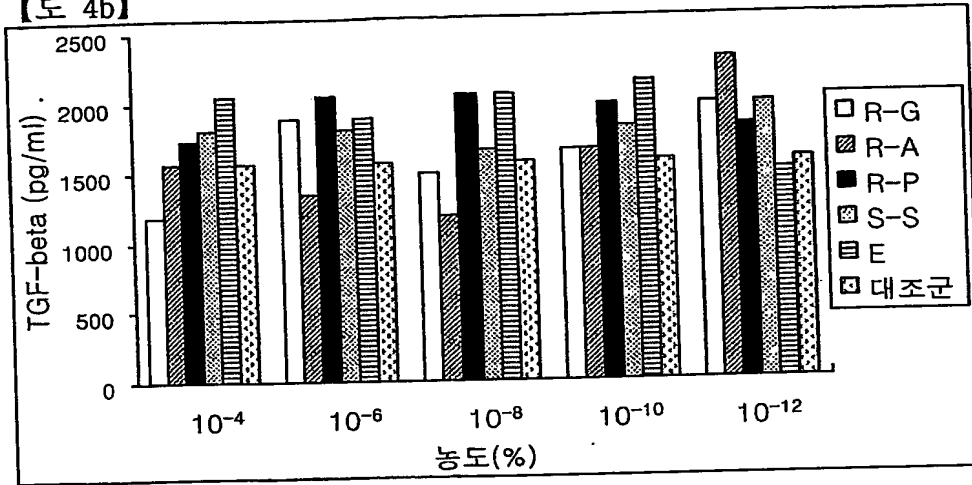


【도 4a】

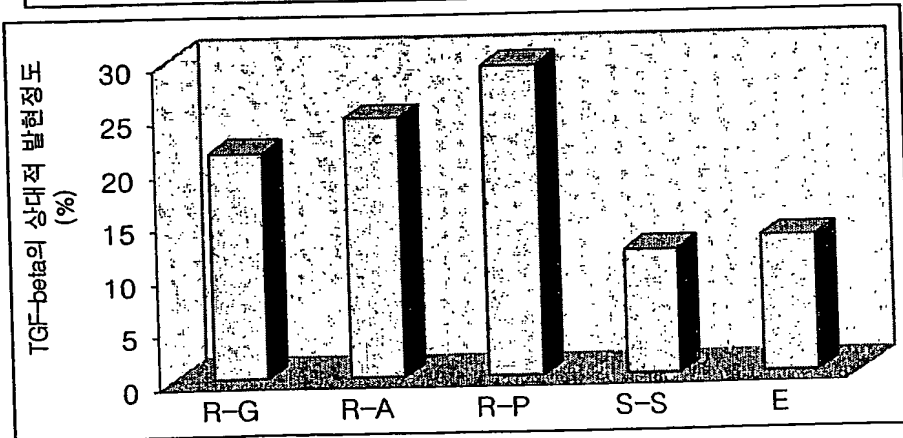
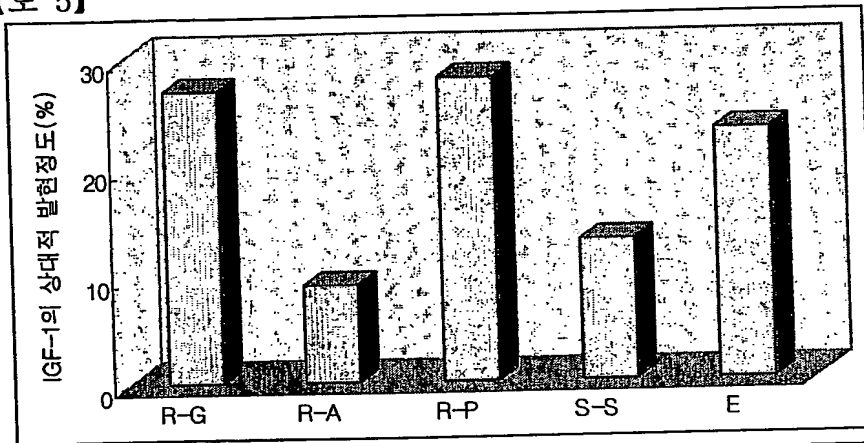




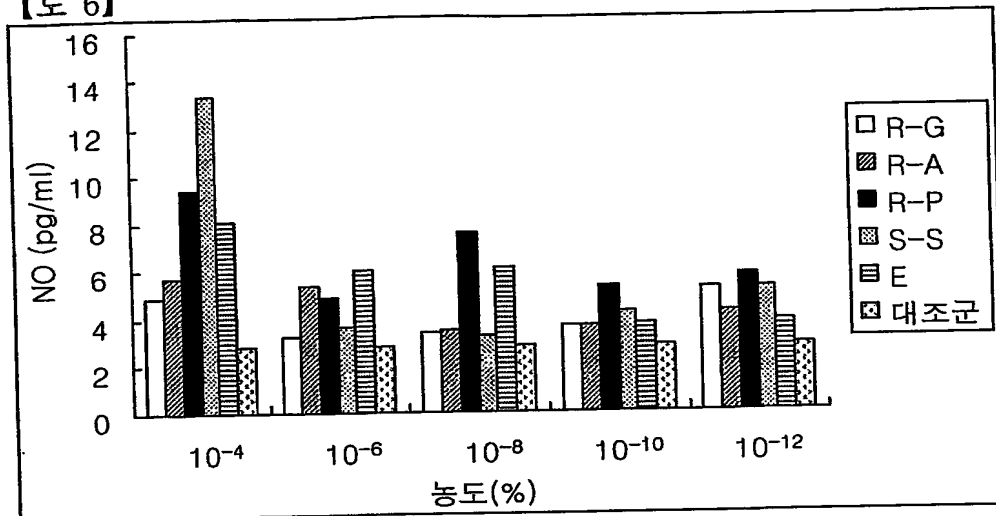
【도 4b】



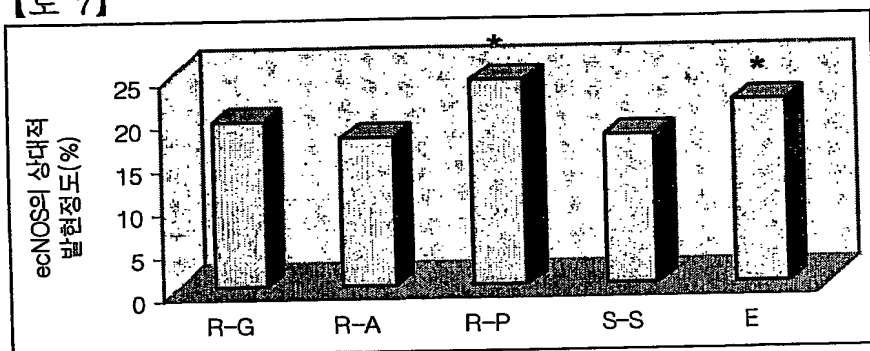
【도 5】



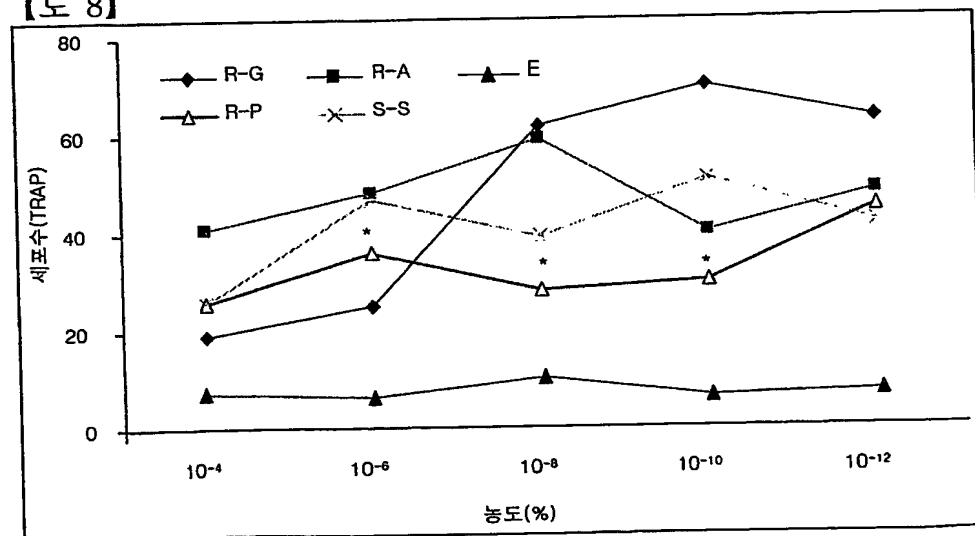
【도 6】



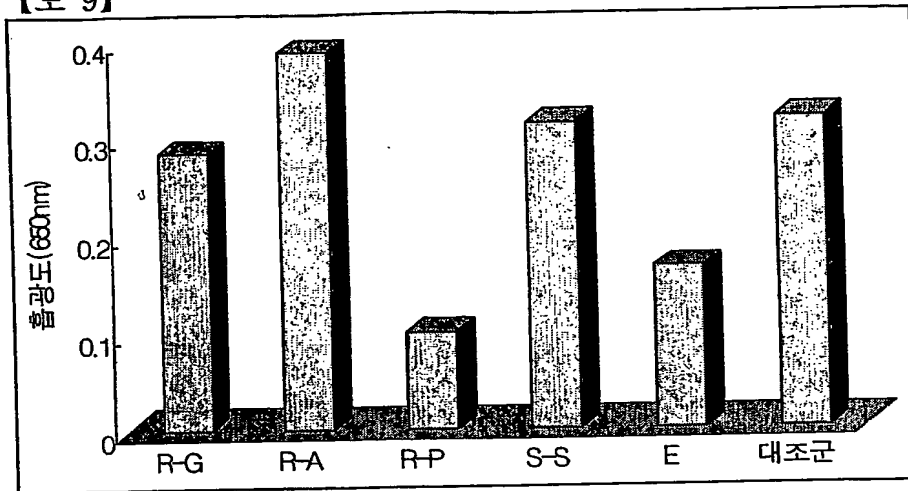
【도 7】



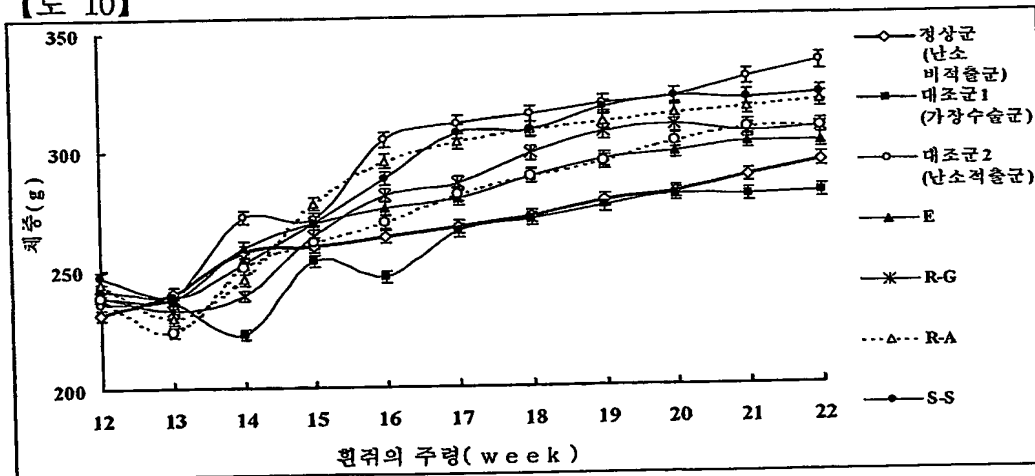
【도 8】



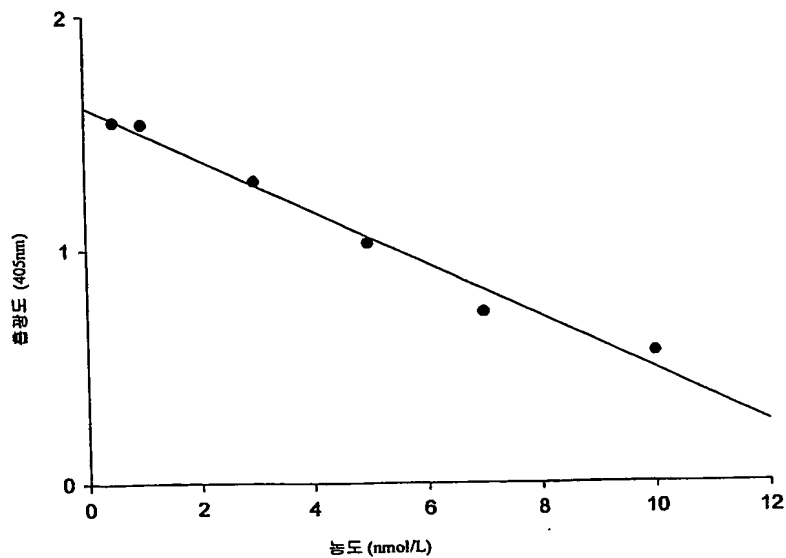
【도 9】



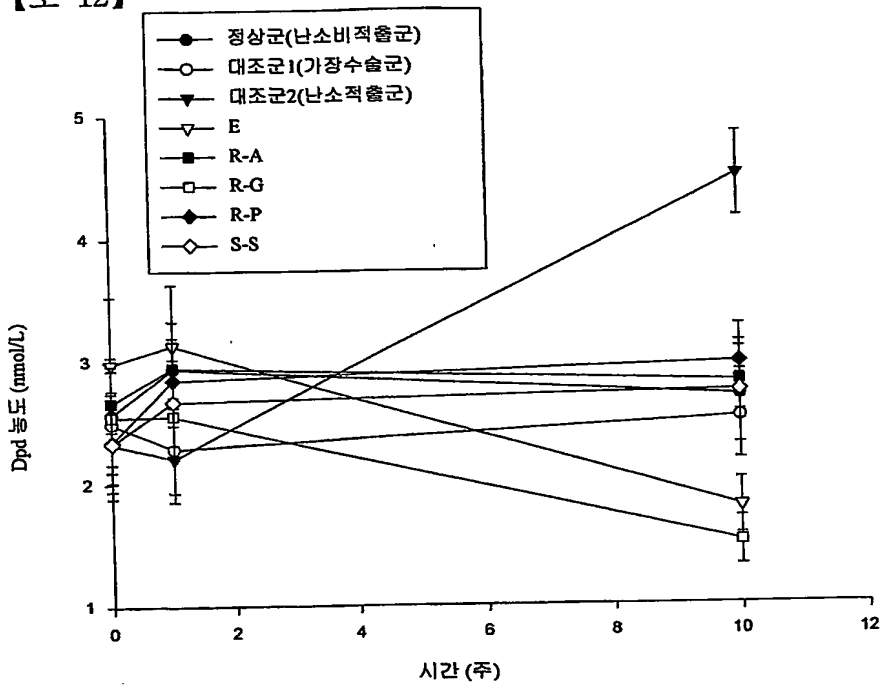
【도 10】



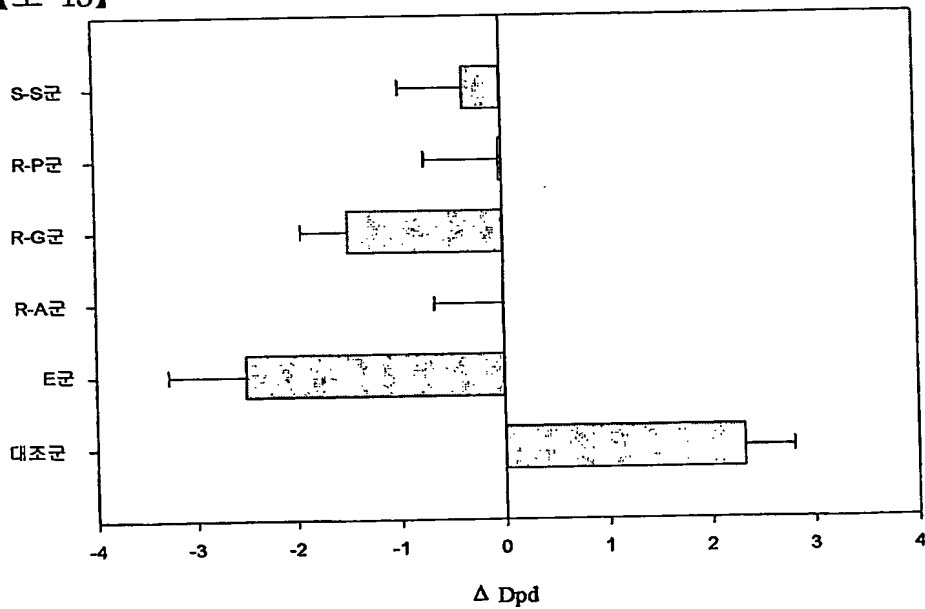
【도 11】



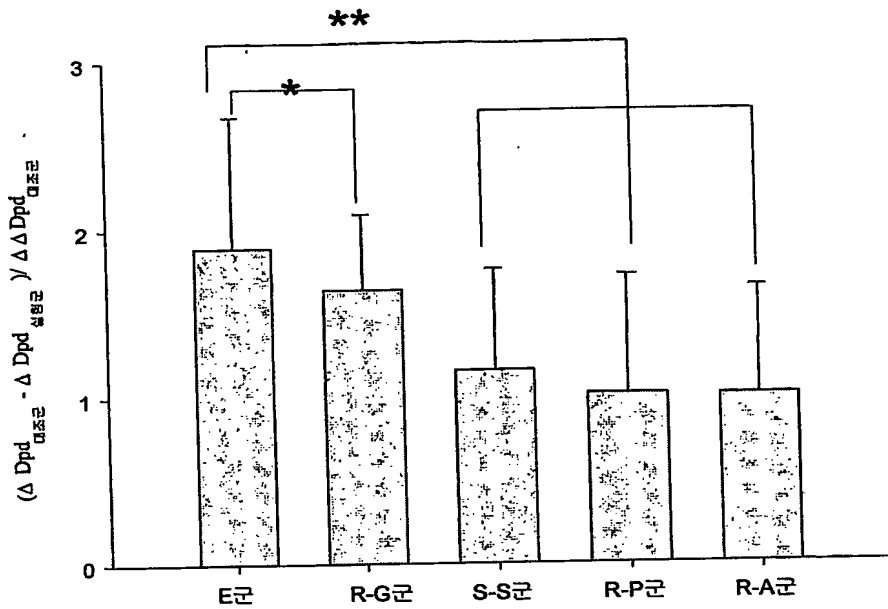
【도 12】



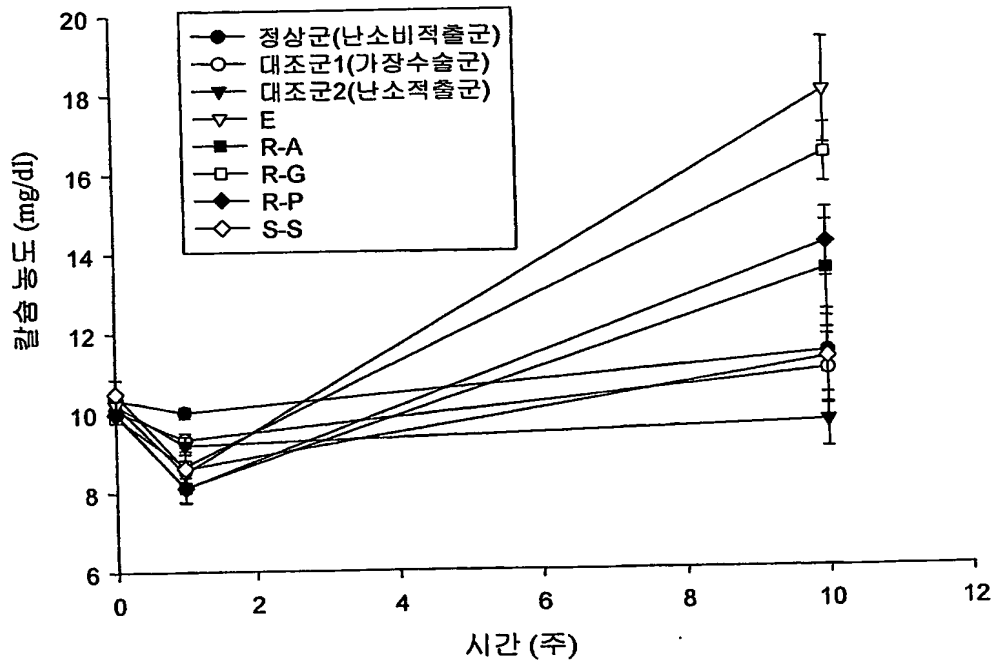
【도 13】



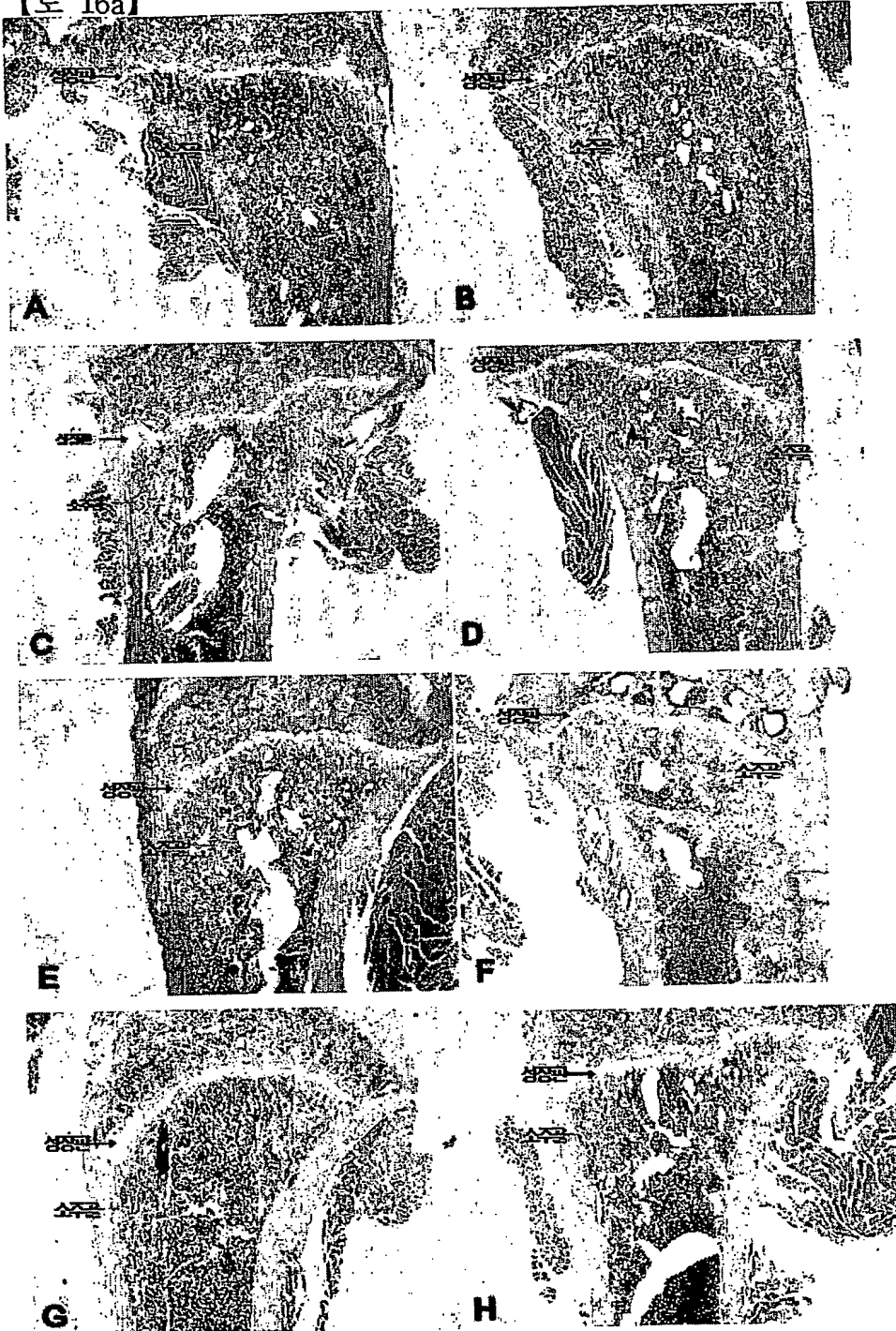
【도 14】



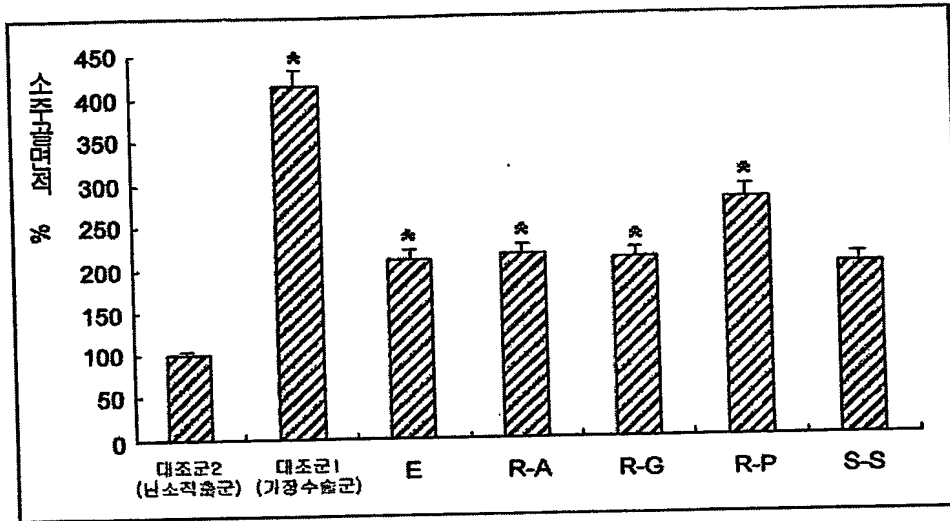
【도 15】



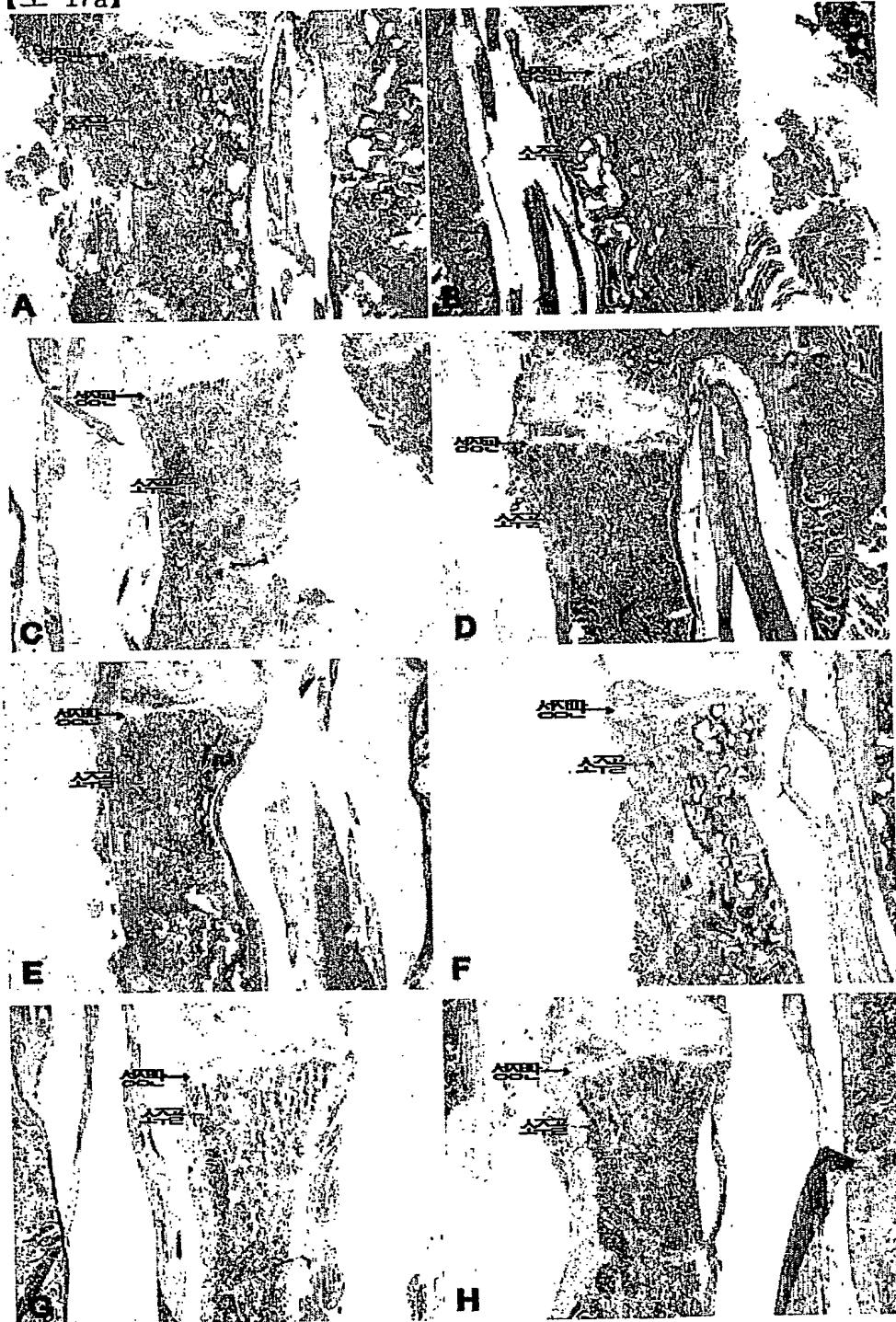
【도 16a】



【도 16b】

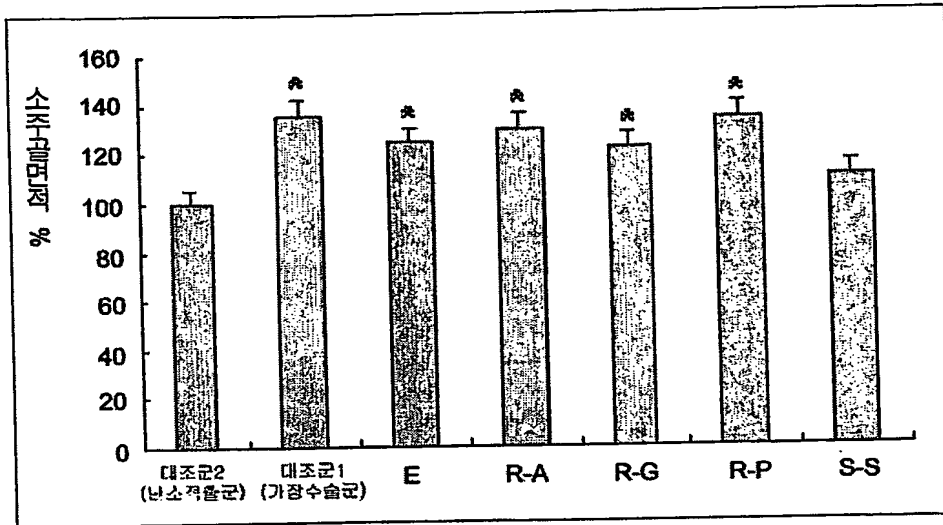


【도 17a】





【도 17b】



## 【서열목록】

<110> REXGENE BIOTECH CO.,LTD <120> Composition For Preventing And Treating Of Climacteric Symptom  
 Comprising Extract Of Sophorae Fructus <160> 10 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 20 <212>  
 DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> primer <400> 1 aggcacaaca ggctgctctg  
 20 <210> 2 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> primer <400> 2  
 tggaccagac atcaccaagc 20 <210> 3 <211> 20 <212>  
 DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> primer <400> 3 agcgccttcg gtccagtgc  
 20 <210> 4 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> primer <400> 4  
 actcatctgc acagctctgg 20 <210> 5 <211> 21 <212>  
 DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> primer <400> 5 cgccctgttc gctctgggta t  
 21 <210> 6 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> primer <400> 6  
 aggaggtccg catgctcaca g 21 <210> 7 <211> 20 <212>  
 DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> primer <400> 7 atgctcttca gttcgtgtgt  
 20 <210> 8 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> primer <400> 8

10 4329

agctgacttg gcaggcttgt

20 <210> 9 <211> 21 <212>

DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> primer <400> 9 aagccgcata cgcacccaga g

21 <210> 10 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> primer <400> 10

tggggtaccg ctgctgggag g

21

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record.**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**